

Saara Kauremaa

Solunulkoisten vesikkelien lyofilisaatiokestävyys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

17.8.2017

Tekijä(t) Otsikko	Saara Kauremaa Solunulkoisten vesikkelien lyofilisaatiokestävyys
Sivumäärä Aika	38 sivua + 2 liitettä 17.8.2017
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioanalytiikka
Suuntautumisvaihtoehto	
Ohjaaja(t)	Tutkijatohtori Mari Palviainen Tutkintovastaava Jarmo Palm
<p>Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää solunulkoisten vesikkelien (engl. <i>Extracellular Vesicles</i> EV) lyofilisaatiokestävyyttä, vaikuttaako lyofilisaatio EV:den kykyyn kulkeutua solun sisään ja onko se haitallista soluille. EV:den merkitys korostuu niiden kykyä siirtää informaatiota solujen välillä vaikuttaen siten vastaanottavan solun ominaisuuksiin ja toimintaan. EV:den mahdollisuus olla apuna diagnostiikassa, soluterapiassa ja lääkeaineiden kuljettajina elimistössä on laajalti kasvavan kansainvälisen tutkimuksen kohteena. EV:t kestävät hyvin säilytystä alhaisissa lämpötiloissa (- 80 °C:ssa ja - 20 °C:ssa). Kylmäkuivattuja EV:tä olisi helppo kuljettaa ja varastoida joko huoneenlämmössä tai jääkaappiolosuhteissa. Näin säilytettynä EV:den käyttöikäkin pidentyisi. EV:n liuottaminen uudelleen käyttöön otettaessa olisi myös vaivatonta. EV:t voidaan jaotella kolmeen pääluokkaan niiden syntymekanismin perusteella: eksosomeihin, mikrovesikkeleihin ja apoptoottisiin vesikkeleihin.</p> <p>Työssä käytettiin PNT2- ja PC3-solulinjan soluja sekä Suomen Punaisen Ristin Veripalvelusta saatua usean luovuttajan verihutaleita sisältävää plasmaa, joista EV:t eristettiin ultrasentrifugoimalla. EV:t karakterisoitiin Western Blot -menetelmällä sekä mittaamalla näytteistä EV:den konsentraatio ja kokojakauma NTA-menetelmällä. Tämän jälkeen eri EV-näytteet lyofilisoitiin ja liuotettiin uudestaan näytteiksi, joiden EV-konsentraatio ja -kokojakauma määritettiin NTA-mittauksella. Tulosten saamiseksi EV:t leimattiin fluoresoivalla värillä ja laitettiin PC3-soluille soluun takaisinottoa varten. Lopuksi näytteet kuvattiin fluoresenssimikroskooppilla takaisinoton todentamiseksi. Työssä tarkasteltiin myös lyofilisoitujen EV:den vaikutusta solujen proliferaatioon.</p> <p>Saaduista tuloksista huomattiin, että PC3-solut ottivat sisäänsä lyofilisoituja EV:tä heikommin kuin pakastettuja EV:tä. Lyofilisaatio ei muuttanut näytteen sisältämien mikrovesikkelien määrää suhteessa eksosomien määrään, mutta mikrovesikkelien kokojakauma vaihteli lyofilisoitujen EV:den ja pakastettujen EV:den keskuudessa. Proliferaatiokoe osoitti verihutale-EV:den vauhdittavan PC3-solujen kasvua. Lyofilisoidut EV:t kiihdyttivät proliferaatiota eksponentiaalisen kasvuvaiheen loppupuolella enemmän kuin pakastetut EV:t. Tuloksista voidaan päätellä, etteivät lyofilisoidut EV:t ole haitallisia soluille ja ne säilyttävät toimintakykynsä. Ajatellessa EV:den lyofilisaatiokestävyyttä tarvitaan lisää tutkimuksia selvittämään eri alkuperästä eristettyjen EV:den kulkeutumista eri soluihin. Sen lisäksi tarvitaan standardoidut menetelmät EV:den eristykseen ja karakterisointiin.</p>	
Avainsanat	Solunulkoiset vesikkelit, lyofilisaatio, kylmäkuivaus, NTA, Western Blot, proliferaatio

Author(s) Title	Saara Kauremaa Lyophilisation Hardiness of Extracellular Vesicles
Number of Pages Date	38 pages + 2 appendices 17 August 2017
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Specialisation option	
Instructor(s)	Mari Palviainen, PhD Jarmo Palm, Head of Degree Programme
<p>The aim of the study was to find out the lyophilisation hardiness of extracellular vesicles (EV), whether lyophilized EVs have an ability to enter the cells and is it harmful to the cells. The importance of EVs is emphasized because of their ability to intercellular communication, thereby affecting the properties and operation of the receiving cell. EVs are emerging as potential biomarkers in various diseases. Also, international research is interested in increasing therapeutic opportunities of EVs including using them for drug delivery. The EVs are very resistant to storage at low temperatures (- 80 °C and - 20 °C). The lyophilized EVs would be easy to transport and store at room temperature or in refrigerator. Hence, the lifetime of EVs would extend. Also, rehydration would be easy to accomplish. EVs can be divided into three main categories based on their biogenesis: exosomes, microvesicles and apoptotic bodies.</p> <p>The cells of the PNT2 and PC3 cell lines and multiple donor platelet-rich plasma (received from Finnish Red Cross) were used in this study. EVs were isolated by ultracentrifuge and characterized by the Western Blot method and measuring the EV concentration and size with Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Subsequently, the EV samples were lyophilized and redissolved to measure the concentration and size by NTA. EVs were labeled with fluorescent dye and placed on PC3 cells for uptake. The samples were photographed by a fluorescence microscope to verify the uptake. The effect of lyophilized EVs on cell proliferation was also studied.</p> <p>From the results obtained, more frozen EVs than lyophilized EVs were uptaken by PC3 cells. Lyophilisation did not change the number of microvesicles contained in the sample in relation to the number of exosomes. Size distribution of the microvesicles varied between lyophilized EVs and frozen EVs, though. The proliferation test indicated that plasma EVs accelerate the growth of PC3 cells. Lyophilized EVs accelerated proliferation more than frozen EVs at the end of exponential phase. It can be concluded that the lyophilized EVs are not harmful to the cells and they preserve their functional capacity. In question of the lyophilisation hardiness of extracellular vesicles further studies are needed to examine the ways of uptake of different cell-derived EVs by different types of cells. In addition, standardized methods for EV isolation and characterization are needed.</p>	
Keywords	Extracellular Vesicles, Lyophilisation, Nanoparticle Tracking Analysis, Western Blot, Proliferation

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Solunulkoiset vesikkelit	2
3	Solunulkoisten vesikkelien käyttömahdollisuuksia	7
3.1	Mahdollisuudet diagnostiikassa	7
3.2	EV:n terapeuttinen mahdollisuus	8
3.3	Verihiutaleiden tuottamat EV:t	10
4	Materiaalit ja menetelmät	11
4.1	Solujen kasvatus ja vesikkelien tuotto	12
4.2	Vesikkelien eristys	13
4.3	Karakterisointi	13
4.3.1	Western Blot	13
4.3.2	NTA-mittaus	14
4.4	Lyofilisaatio	18
4.5	Saatujen vesikkelien sisäänotto soluihin	18
4.5.1	EV:den leimaus	19
4.5.2	Takaisinotto soluihin	20
4.5.3	Mikroskopointi	21
4.6	Proliferaatiokoe	21
5	Tulokset	24
5.1	Karakterisoinnin tulokset	24
5.1.1	Western Blot -menetelmän tulokset	24
5.1.2	NTA-mittaustulokset	25
5.2	Mikroskopointitulokset	28
5.3	Proliferaatiokokeen tulokset	30
6	Tulosten pohdinta	32
6.1	Lyofilisaation vaikutus NTA-mittaukseen	32
6.2	Lyofilisaation vaikutus solunulkoisten vesikkelien sisäänottoon soluihin	32
6.3	Lyofilisaation vaikutus solujen proliferaatioon	33

7	Yhteenveto	34
	Lähteet	36
	Liitteet	
	Liite 1. NTA-mittausten tulokset	
	Liite 2. Proliferaatiokokeen kasvukäyrät	

Lyhenteet

ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> , tehostettu kemiluminesenssi. Western blot -menetelmässä yleisesti käytetty detektiosubstraatti.
EV	<i>Extracellular Vesicle</i> , solunulkoinen vesikkeli.
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , naudan sikiön seerumi.
FIMM	<i>Institute for Molecular Medicine Finland</i> , Suomen molekyyliääketieteen instituutti.
iPSC	<i>Induced Pluripotent Stem Cell</i> , indusoitu pluripotentti kantasolu
ISEV	<i>International Society for Extracellular Vesicles</i> , kansainvälinen EV-yhdistys.
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i> , alkion sidekudoskantasolu.
MVB	<i>Multivesicular Body</i> , monivesikkelinen kappale.
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> , nanopartikkeleiden jäljitysanalyysi. Valonsirontaan perustuva analyysimenetelmä, jolla analysoidaan halkaisijaltaan nanometrien kokoisia partikkeleita.
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , fosforilla puskuroitu keittosuolaliuos.
PC3	<i>Human Prostate Cancer cell line</i> . Ihmisen eturauhassyöpäsolulinja.
PFA	<i>Paraformaldehyde</i> , paraformaldehydi. Solubiologiassa yleisesti käytetty fiksausaine soluja värjätessä.
PFP	<i>Platelet Free Plasma</i> . Plasma, josta on poistettu verihiutaleet.
PNT2	<i>Human Prostate Normal cell line</i> . Aikuisen ihmisen eturauhasepiteeli-solulinja.

- SDS-PAGE *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, natrium-dodekyylisulfaattipolyakryliamidigeelielektroforeesi. Proteiinikemiassa käytetty molekyylien erottelu- ja analyysimenetelmä.
- SV40 *Simian Virus 40*, rhesus apinan munuaisesta löydetty virus, jonka genomia käytetään yleisesti tekemään tutkimuskäyttöön tarkoitettuja solulinjoja kuolemattomiksi.
- TBS-T *Tris Buffered Saline Tween 20*, tris(hydroksimetyyli)aminometaanilla puskuroitu keittosuolaliuos, johon on lisätty 0,1 % Tween 20:tä.

1 Johdanto

Opinnäytetyön teon mahdollisti EV-tutkimusryhmä, joka on Helsingin yliopiston biotieteiden osaston (Bio- ja ympäristötieteiden laitos) ja farmaseuttisten biotieteiden osaston (Farmasian laitos) yhteinen ryhmä. Osana EV-tutkimusryhmää toimii myös biotieteiden osaston ja farmasian laitoksen sekä Suomen molekyyli lääketieteen instituutin (FIMM) ylläpitämä maksupalveluyksikkö EV Core. EV Core:lla on kaksi laboratoriota (Viikissä ja Biomedicumissa Helsingissä), joissa solunulkoisten vesikkelien (*eng. Extracellular Vesicles*, EV) tutkimusta ja liiketoimintaa harjoitetaan.

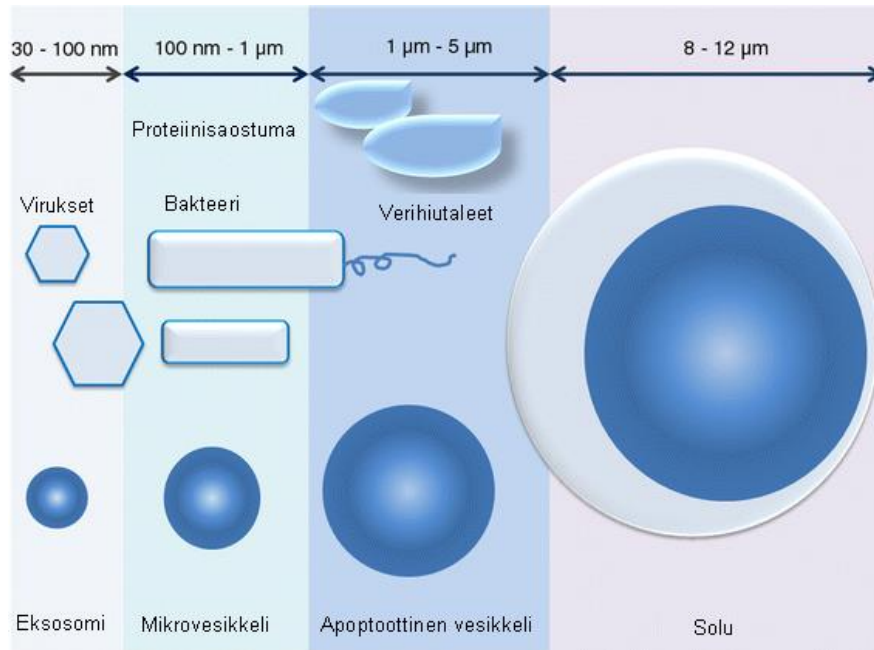
EV-tutkimusryhmä Viikissä keskittyy tutkimuksissaan ymmärtämään, kuinka eri solulähteistä peräisin olevat EV-signaalit toimivat välittäjinä ja säätelevät solujen toimintaa esimerkiksi tulehdusten aikana. Yksi tutkimuksen kohteista on selvittää, kuinka solunulkoisia vesikkeleitä voitaisiin käyttää apuna diagnostiikassa, soluterapiassa ja lääkeaineiden kuljettajina elimistössä. FIMM:ssä toimiva tutkimusryhmä puolestaan tutkii tautibiomarkkereita nestemäisistä näytteistä hyödyntäen olemassa olevia biopankkeja, kuten Helsingin urologista biopankkia.

Työn tavoitteena oli selvittää EV:den lyofilisaatiokestävyyttä, vaikuttaako lyofilisaatio EV:den kykyyn kulkeutua solun sisään ja onko se haitallista soluille. EV:den merkitys korostuu niiden kykyä siirtää informaatiota solujen välillä vaikuttaen siten vastaanottavan solun ominaisuuksiin ja toimintaan, kuten esimerkiksi solun liikkeeseen, adhesiivisuuteen tai metastaattiseen kykyyn [1]. Tästä syystä EV:t ovat laajalti kasvavan kansainvälisen tutkimuksen kohteena.

EV:t kestävät hyvin säilytystä alhaisissa lämpötiloissa, - 80 °C:ssa ja - 20 °C:ssa, mutta säilytys + 4 °C:ssa pidentäisi niiden käyttöikää verrattuna pakastettuihin EV:hin. Eristyksen jälkeen EV:t ovat liuenneina sopivaan liuottimeen. Liuotin poistetaan lyofilisaatiossa vakuumin avulla erillisellä lyofilisaattorilla, jonka jälkeen jäljelle jäävät EV:t ovat kiinteässä muodossa. Kylmäkuivattuja EV:tä olisi helppo kuljettaa ja varastoida joko huoneenlämmössä tai jääkaappiolosuhteissa. Myös EV:den liuottaminen uudelleen käyttöön otettaessa olisi vaivatonta.

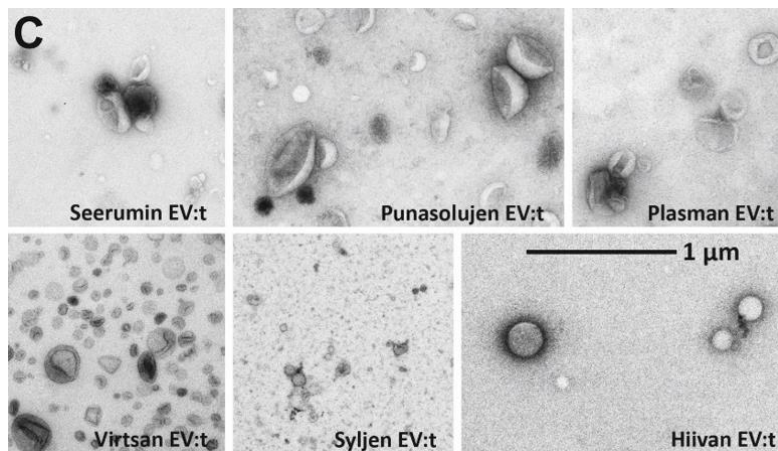
2 Solunulkoiset vesikkelit

Solunulkoiset vesikkelit ovat kaksoislipidimembraanin ympäröimiä pyöreitä nanopartikkeleita, joita pääsääntöisesti kaikki prokaryootti- ja eukaryoottisolut erittävät. EV:den koko vaihtelee 30 nm–1 µm välillä (kuva 1). [2.]



Kuva 1. Solunulkoiset vesikkelit ovat kooltaan viruksien, bakteerien ja verihiutaleiden kokoisia partikkeleita [3, muokattu].

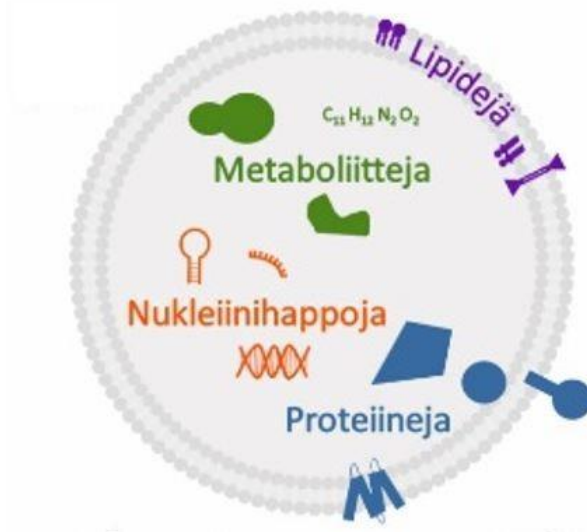
EV:tä voidaan eristää mm. ihmiskehon nesteistä ja eritteistä, kuten verestä, syljestä, äidinmaidosta, sappinesteestä tai virtsasta (kuva 2) [4].



Kuva 2. Eri lähteistä eristettyjä kokonaisia EV:tä kuvattuna transmissioelektronimikroskoopilla [5].

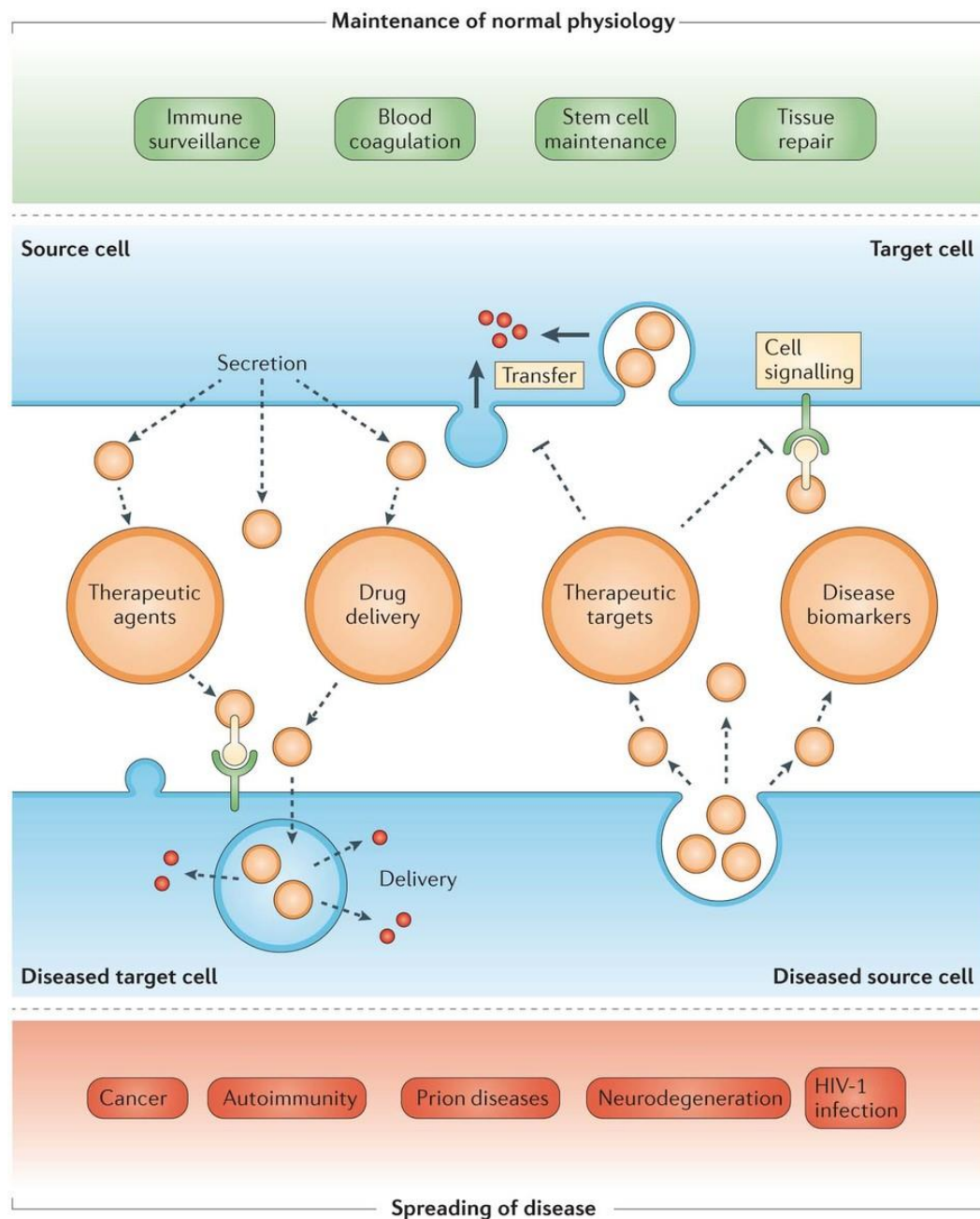
Myös kasvien apoplastisista nesteistä on eristetty eksosomeja [6]. Solut erittävät EV:tä perustilassa ollessaan ja niiden erityks lisääntyy soluproliferaatiossa ja solun aktivoituessa esimerkiksi stressin vaikutuksesta [7, s. 232].

EV:t kuljettavat sisällään tai pinnassaan monia molekyylejä, kuten lipidejä, proteiineja, metaboliitteja, mRNA:ta ja miRNA:ta (kuva 3) [7, s. 233]. Kuljetettava molekyyli riippuu tuottajasolusta ja niistä olosuhteista, joissa tuottajasolut kulloinkin ovat [5].



Kuva 3. EV:den kuljettamat molekyylit riippuvat tuottajasoluista [5].

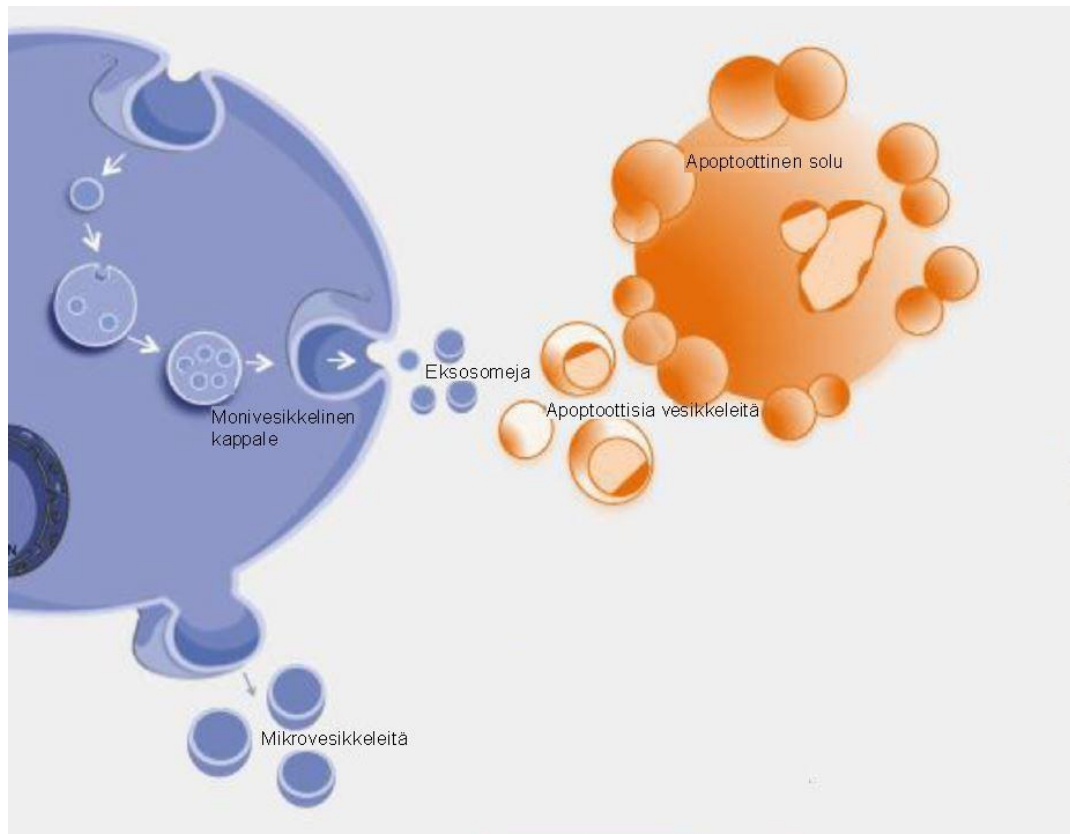
EV:t osallistuvat fysiologian ylläpitoon, kuten esimerkiksi immuunivalvontaan, veren hyytymiseen, kantasolujen ylläpitoon ja kudosten korjaukseen. Ottaen huomioon nämä vaikutukset ja EV:den kyvyn siirtää kuljettamiaan molekyylejä vastaanottaviin soluihin EV:tä voitaisiin käyttää elimistössä terapeuttisina aineina ja lääkeaineiden kuljettajina. Toisaalta näiden samojen ominaisuuksien johdosta EV:t osallistuvat myös patologiin soluprosesseihin, kuten esimerkiksi aiheuttaen immuunitoleranssia, levittäen syöpägeenejä tai aiheuttaen sairauksien etenemisiä. Näihin prosesseihin osallistuminen mahdollistaa kuitenkin EV:den potentiaalisen käytön sairauksien biomarkkereina. (Kuva 4.) [8.]



Nature Reviews | Drug Discovery

Kuva 4. EV:t toimivat tärkeinä välittäjäaineina solujen välisessä signaloinnissa sekä fysiologisissa että patologisissa soluprosesseissa [8].

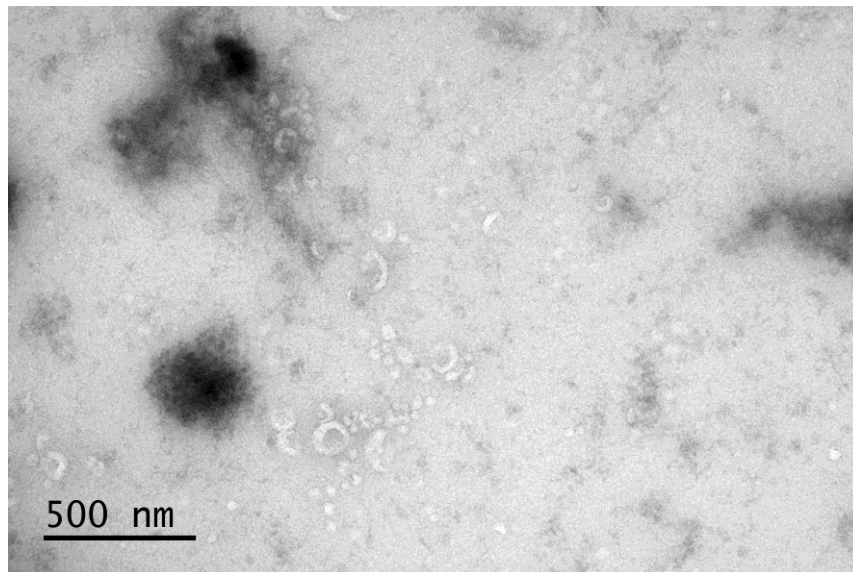
EV:t voidaan jaotella kolmeen pääluokkaan niiden syntymekanismin perusteella: ekso-someihin, mikrovesikkeleihin ja apoptoottisiin vesikkeleihin (engl. *Apoptotic Body*) (kuva 5) [9].



Kuva 5. Kolme tärkeintä EV-populaatiota eroavat toisistaan syntytavoiltaan [6, muokattu].

Vanhemmassa kirjallisuudessa on nähtävissä myös muita termejä (ektosomi, onkosomi, prostasomi ym.) käytettävän solunulkoisille vesikkeleille, mutta tutkimusten laajentuessa huomattavasti viime vuosina kansainvälinen EV-yhdistys (ISEV) suosittelee käytettävän yleisnimitystä *extracellular vesicles* kolmen pääpopulaationimityksen lisäksi [5].

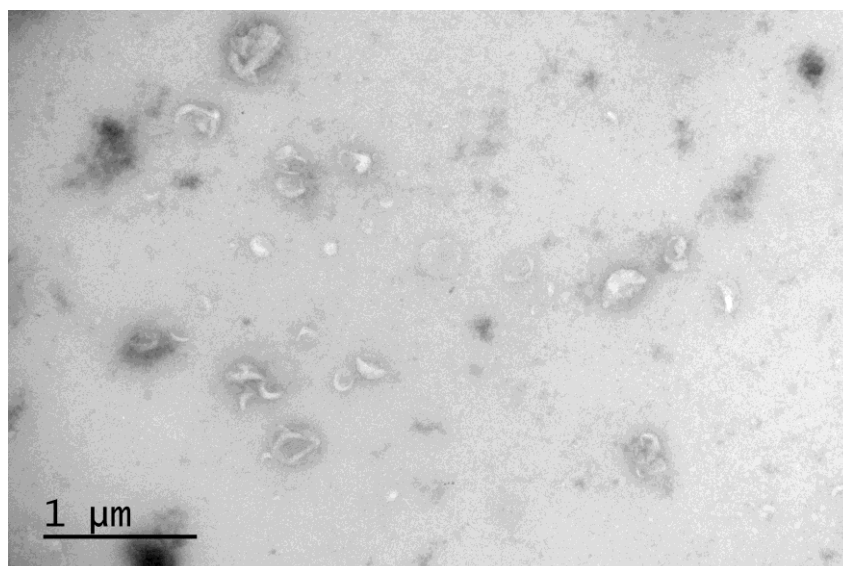
Eksosomit ovat halkaisijaltaan 30–100 nm kokoisia nanopartikkeleita (kuva 6), jotka edustavat homogeenistä vesikkelipopulaatiota [10, s. 206].



Kuva 6. PNT2-solujen erittämiä eksosomeja. Elektronimikroskooppikuva Mari Palviainen.

Eksosomit syntyvät monivesikkelisten kappaleiden (engl. *Multivesicular Body* MVB) yhtyessä plasmamembraaniin ja sen kuroutuessa ulos [10, s. 206]. Ne sisältävät useita biomolekyylejä, kuten mRNA:ta, miRNA:ta, ei-koodaava RNA:ta, sytoplasma- ja membraaniproteiineja [11].

Mikrovesikkelit ovat heterogeeninen EV-populaatio. Ne ovat halkaisijaltaan hieman suurempia kuin eksosomit, 50–1000 nm (kuva 7) [9].



Kuva 7. PNT2-solujen erittämiä mikrovesikkeitä. Elektronimikroskooppikuva Mari Palviainen.

Mikrovesikkelit syntyvät kuroutumalla suoraan solumembraanista [12]. Ne sisältävät eksosomien tavoin useita biomolekyylejä, esimerkiksi mRNA:ta, miRNA:ta, ei-koodaava RNA:ta sekä sytoplasma- ja membraaniproteiineja [11].

Apoptooppiset vesikkelit eroavat kahdesta muusta EV-populaatiosta suhteellisen suuren kokonsa, 500–2000 nm, puolesta. Ne syntyvät ohjelmoidun solukuoleman (*eng. Apoptosis*) seurauksena. [12.] Apoptooppiset vesikkelit sisältävät tumen kappaleita ja soluorganelleja [11].

3 Solunulkoisten vesikkelien käyttömahdollisuuksia

3.1 Mahdollisuudet diagnostiikassa

Solujen välisen kommunikoinnin lisäksi EV:den rooli tautibiomarkkereina on jatkuvan tutkimuksen kohteena. EV:llä voidaan ajatella olevan lukuisia käyttömahdollisuuksia diagnostiikassa, koska niiden erityis lisääntyy muun muassa solustressin aikana. On todettu, että verihytaleiden EV-eritys lisääntyy esimerkiksi sydän- ja verisuonisairauksissa, tulehduksissa ja veritulppaa edeltävissä tiloissa [13]. Biomarkkerit perinteisesti luokitellaan biologisten tai patogeenisten prosessien osoittajiksi, mutta nykytutkimus käsittää biomarkkereiden käytön sairausriskien arvioimisessa, tautien käyttäytymisen ennustamisessa tai elion mahdollisille vierasaineille altistumisessa.

EV:t sisältävät kalvoproteiineja, tetraspaniineja (*engl. tetraspanins*), kuten CD9, CD63 ja CD81, lämpöshokkiproteiineja (esim. HSP90) sekä MVB-proteiineja, kuten TSG101 ja Alix. Esimerkiksi lämpö-, hapetus- tai happikatostressi lisäävät lämpöshokkiproteiinien eristystä useilla solutyypeillä. [14.] Syöpäsolujen, esimerkiksi eturauhassyöpäsolujen, on todettu erittävän EV:tä, jotka sisältävät kalvo- ja lämpöshokkiproteiineja, jolloin näiden lisääntynyttä määrää voidaan käyttää apuna tautidiagnoosissa [15]. EV:den sisältämiä proteiineja voidaan karakterisoida esimerkiksi immunoblottauksella, elektronimikroskoopilla (immunoleimaus) sekä virtausytometrianalyysillä [6].

Syövän havaitseminen on eräs seikka, jossa EV:den käyttökelpoisuus biomarkkerina korostuu. Tämä johtuu EV:den roolista syöpäkasvaimen muodostumisessa. Myös virukset (esim. HIV ja hepatiitti C) hyödyntävät EV:tä leviämiseessään, jolloin niitä voidaan käyttää myös virustautien diagnosointiin. Tutkimuksissa on yhdistetty EV:tä edellä mainittujen

sairauksien lisäksi neurologisiin ja metabolisiin sairauksiin sekä munuaistauteihin, joten ne antavat mahdollisuuden EV:den käyttöön biomarkkereina myös näissä tapauksissa. [16.] Potilasnäkökulmasta katsottuna EV:den käyttö biomarkkereina voisi vähentää esimerkiksi näytepalan ottamisia ja olisi näin ollen potilasystävällisempi keino diagnosoida sairauksia. Myös silloin, kun kasvain on erittäin hankalassa paikassa eikä koepalan ottaminen ole mahdollista, EV:den avulla voidaan saada kuva siitä, minkälaisesta kasvaimesta on kyse.

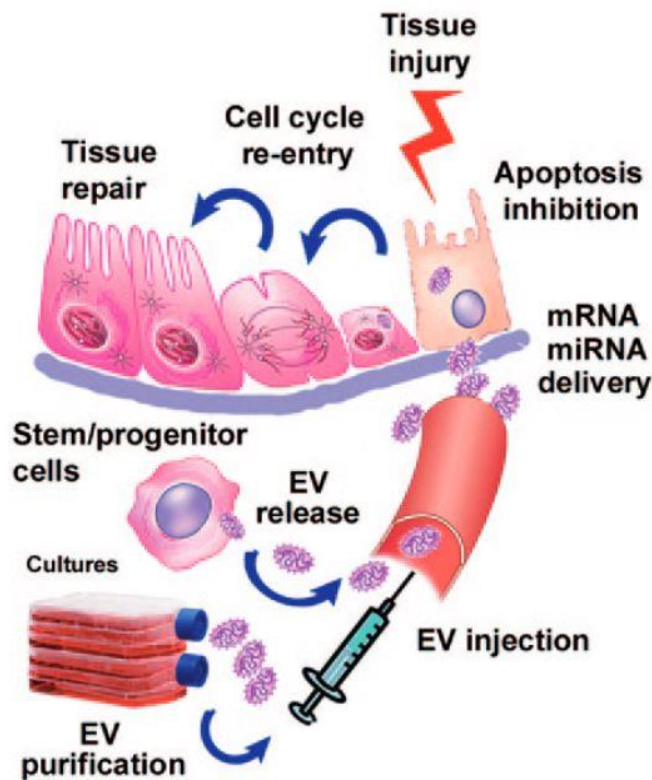
3.2 EV:n terapeuttinen mahdollisuus

EV:den luontainen kyky kuljettaa aktiivisia biomolekyylejä solujen välillä on inspiroinut tutkijoita selvittämään niiden käyttöä soluterapiassa. Tämän hetkiset tutkimukset yrittävät selvittää varmoja ja toistettavia keinoja, kuinka saada EV:t kuljettamaan eksogeenisiä geneettisiä molekyylejä kuten esimerkiksi siRNA:ta. Näin EV:llä olisi myös tärkeä rooli horisontaalisessa geenisiirrossa, mikä tukisi niiden terapeuttisia mahdollisuuksia. [17.]

Perinteisten syöpähoitojen (leikkaus, kemoterapia ja sädehoito) lisäksi syöpää hoidetaan kohdennetulla terapialla. EV:den on todettu osallistuvan syöpäsolujen väliseen kommunikointiin, kasvaimen kehittymiseen ja metastasoitumiseen tiettyyn kudokseen [18]. Viimeaikaiset tutkimukset ovat myös osoittaneet, että EV:t toimivat viestinvälittäjinä kantasolujen ja syöpäsolujen välillä. Kantasolut erittävät runsaasti eksosomeja, jotka toimivat tiedonkuljettajina kasvaimessa. [19.] Varsinkin ihmisen alkion sidekudoskantasolujen (engl. *Mesenchymal Stem Cell* MSC) on todettu tuottavan eniten EV:tä verrattuna muihin solutyyppeihin. MSC:t tuottavat runsaasti muun muassa sytokiineja, kemokiineja ja miRNA:ta, jonka vuoksi niiden käyttö terapiassa houkuttelee tutkijoita. [20.] Näyttöjä EV-terapian käytöstä myös tulehdussairauksien hoidossa esiintyy enenevässä määrin [21]. Viimeaikaisissa tutkimuksissa hiirimalleilla on myös havaittu, että MSC:n erittämällä EV:llä voitaisiin estää autoimmuunisairauksien, esimerkiksi ykköstyypin diabeteksen, puhkeaminen. Toisaalta tutkimuksissa on havaittu suonensisäisen MSC:n annostelun aiheuttavan hiirille veritulpan tai kuoleman. Tästä johtuen pitkäaikaisia lisätutkimuksia tarvitaan ihmiselle turvallisen hoitomuodon löytämiseksi. [20.]

Tutkimuksissa on myös todettu kantasolujen erittämien EV:den osallistuvan vaurioituneen kudoksen uusiutumiseen tietyissä olosuhteissa. Lisäksi tutkimukset osoittavat, että

kantasoluja voidaan muokata epigeneettisesti saaden niissä aikaan fenotyypin muutoksia. (Kuva 8.) [7; 9.]



Kuva 8. Paikallisten kantasolujen erittämät EV:t paikallistavat vaurioituneen kudoksen solut ja ohjelmoivat ne uudestaan proteiinien, mRNA:n ja miRNA:n avulla samalla estäen apoptoosia. Solujen uudelleenohjelmointi aktivoidaan injektoimalla suonensisäisesti in vitro tuotettuja EV:tä. [7, s. 237.]

Soluterapiaa ajatellen kantasoluperäisten EV:den käytöllä on enemmän etuja, kuin esimerkiksi alkion kantasolujen tai indusoitujen pluripotenttien kantasolujen (iPSC) käytöllä. iPSC-soluilla esimerkiksi on suurempi riski tuumorigeneesiin ja erilaisiin differentioitumishäiriöihin. Turvallisuuden lisäksi EV:t säilyvät stabiileina verenkierrossa menettämättä toimintakykyänsä [9]. EV:den etuna on myös niiden pieni koko ja joustavuus, mikä mahdollistaa niiden kulkeutumisen biologisten kalvojen läpi. Tästä johtuen EV:t voisivat olla potentiaalisia lääkkeiden kuljettimia. EV:den on todettu läpäisevän myös veri-aivoesteen, joka mahdollistaisi keskushermostosairauksien hoitamisen nykyistä suuremmalla valikoimalla lääkkeitä [7, s. 240]. EV:den kaksoislipidikalvo puolestaan suojaa kuljetettavia molekyylilasteja hajoamiselta, jolloin niiden toimittaminen kohdesoluun helpottuu. Tutkijat uskovatkin EV:den terapeuttisen käytön mahdollisuuksiin syöpähoidon lisäksi immuunivastetta heikentävien sairauksien hoidossa, kuin myös neurodegeneratiivisten

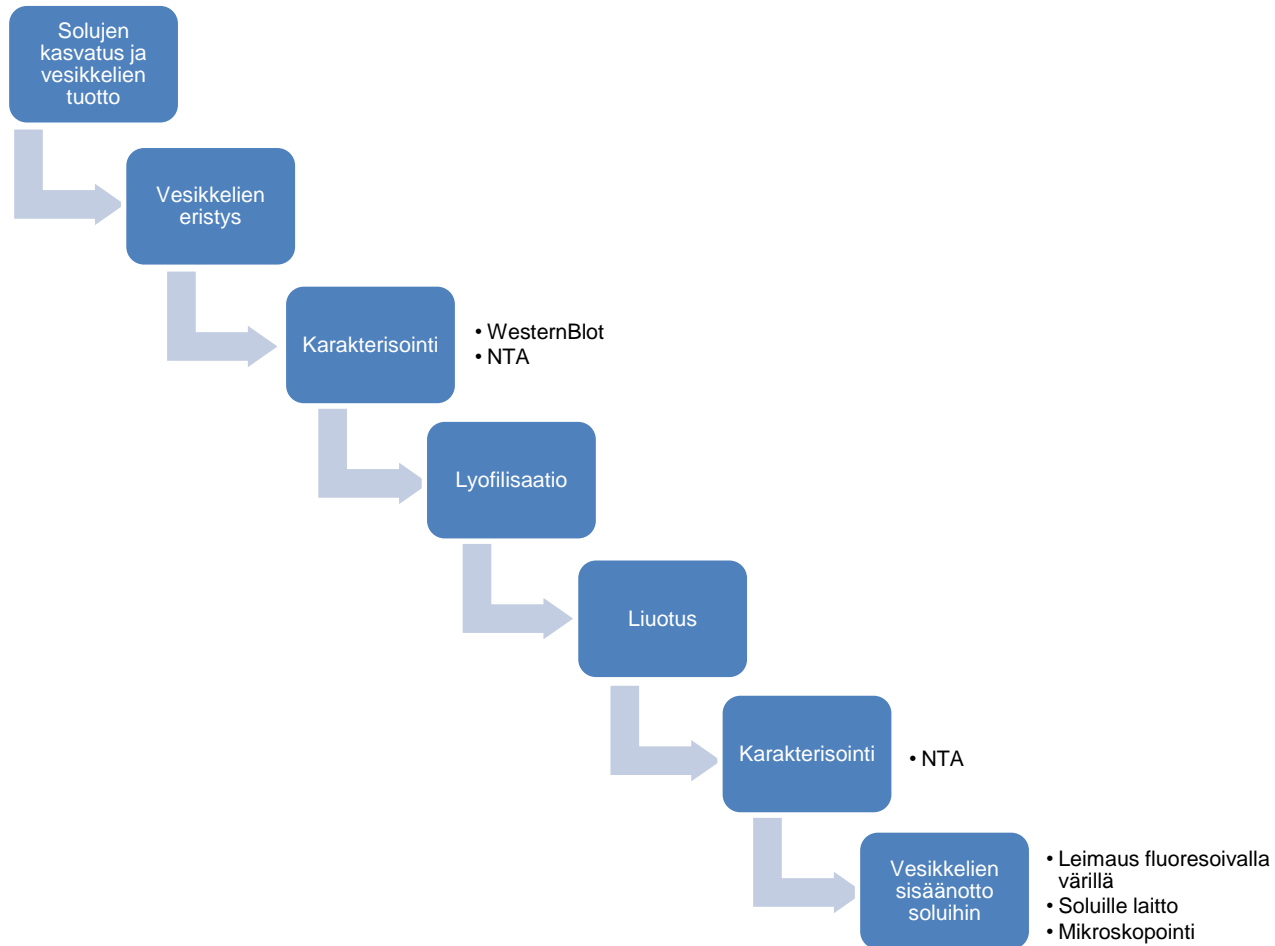
sairauksien, kuten Alzheimerin tauti, hoidossa. [22.] EV:den käytöllä tulee olemaan tulevaisuudessa myös merkittäviä etuja, kun ajatellaan niiden tuottamisesta aiheutuvia kustannuksia, säilyvyyttä ja lainsäädäntöä eettisten näkökulmien poistuessa.

3.3 Verihiutaleiden tuottamat EV:t

EV:den olemassaolosta veressä on raportoitu ensimmäisen kerran melkein 70 vuotta sitten [6]. Suurin osa ihmisen veressä olevista EV:stä on peräisin verihiutaleista, vaikka valko- ja punasolutkin tuottavat niitä [22]. Verihiutaleet tuottavat sekä eksosomeja että mikrovesikkeleitä [23]. Nykypäivänä ISEV suosittelee EV-veritutkimuksissa käytettäväksi veren fysiologista nestettä plasmaa. Plasma-EV:t ovat sekoitus verisuonia vuoraavien solujen ja verestä löytyvien solujen erittämistä vesikkeleistä. Kuitenkin niiden karakterisoinnissa voidaan käyttää verihiutaleille spesifisiä markkereita. EV:n kyky osallistua hemostaasiin parantamalla veren hyytymistä onkin yksi tärkeimmistä verihiutaleiden tuottamien EV:n rooleista. [6.] Tämän lisäksi verihiutaleiden tuottamien EV:den määrä lisääntyy jo aiemmin mainituissa sydän- ja verisuonitauksissa, autoimmuunisairauksissa ja tulehdustiloissa. Plasma-EV:den on myös todettu osallistuvan äidin ja sikiön väliseen solukommunikaatioon raskauden aikana ja näin ollen niiden toiminnan ymmärtämisestä voi olla hyötyä esimerkiksi raskausmyrkytykseen johtavien seikkojen löytämisessä [6].

4 Materiaalit ja menetelmät

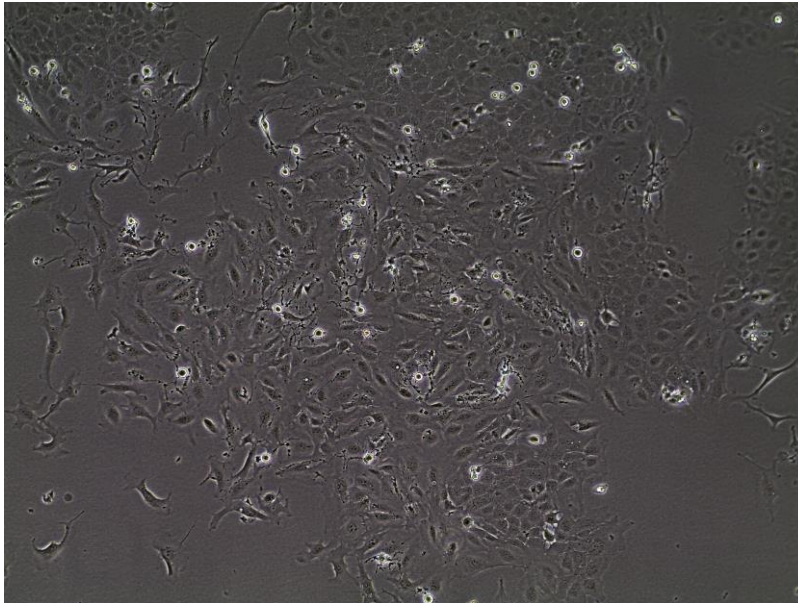
Työn suoritus on kuvattu alla olevassa vuokaaviossa.



Työssä käytettiin kahden eri solulinjan soluja (PNT2-soluja ja PC3-soluja) sekä Suomen Punaisen Ristin Veripalvelusta saatua usean luovuttajan verihiutaleita sisältävää plasmaa, joista EV:t eristettiin. PC3-solulinjan solut olivat tässä laboratoriossa aiemmin kasvatettuja solulinjan soluja. EV:t karakterisoitiin Western Blot -menetelmällä sekä mittaamalla näytteistä EV:den konsentraatio ja kokojakauma NTA-menetelmällä. Tämän jälkeen eri EV-näytteet lyofilisoitiin ja liuotettiin uudestaan näytteiksi, joiden EV-konsentraatio ja -kokojakauma voitiin määrittää NTA-mittauksella. Tulosten saamiseksi EV:t leimattiin fluoresoivalla värillä ja laitettiin PC3-soluille soluun takaisinottoa varten. Lopuksi näytteet kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla takaisinoton todentamiseksi.

4.1 Solujen kasvatus ja vesikkelien tuotto

Vesikkelien tuottamiseen käytettiin PNT2-solulinjan (ATCC) soluja (kuva 9).



Kuva 9. PNT2-soluja kuvattuna EVOS-solukuvantimella. Kuva Saara Kauremaa.

PNT2-solulinjan solut ovat aikuisen ihmisen eturauhasepiteelisoluja, jotka ovat transfektoitu SV40-genomin sisältämällä plasmidilla immortalisaation saavuttamiseksi. Solut su-latettiin vesihauteessa ja siirrostettiin kasvamaan T-75 –kasvatuspulloon. Kasvatusmediumina käytettiin RPMI 1640 –mediumia (Lonza, LOT 6MB135, exp. 7/2018), johon oli lisätty 10 % seerumia (FBS), 1 % L-glutamiinia (L-Glutamine 200 mM, Gibco) ja antibiootteja (1 % penisilliini/streptomysiini). Soluja kasvatettiin + 37 °C:ssa, 5 % CO₂:ssa inkubaattorissa. Solut siirrostettiin tuottamaan vesikkelejä kolmitasopulloon. Seerumina käytettiin EV-depletoitua seerumia (FBS), jotta tavallisen seerumin sisältämät vesikkelit eivät häiritsisi työtä. Seerumista oli poistettu suurin osa (noin 90 %) vesikkeleistä ultrasentrifugoimalla seerumia 100 000 x g:n voimalla 18 tuntia. Soluja kasvatettiin yhä (+ 37 °C, 5 % CO₂) useamman näytteen saamiseksi ja EV:den tuottamiseksi ennen eristystä.

4.2 Vesikkelien eristys

PNT2-solujen tuottamat EV:t (eksosomit ja mikrovesikkelit) eristettiin peräkkäisellä eroteluserifugoinnilla (engl. *sequential differential centrifugation*). Kasvatusmedium kaadettiin kolmitasopulloista 50 ml:n Falcon-putkiin ja sentrifugoitiin 3000 x g, 20 minuuttia, + 4 °C:ssa (Eppendorf Centrifuge 5702 R). Saatu supernatantti jaettiin ultrasentrifugipulloihin, jotka tasapainotettiin analyysivaa'alla (Mettler Toledo PB303-S/FACT). Pulloja sentrifugoitiin ultrasentrifugilla 100 000 x g, 2 h, + 4 °C:ssa (Beckman Coulter Optima LE-8K Ultrasentrifuge, roottori S/N 15U4218 TYPE 50,2 Ti). Saadut pelletit liuotettiin 500 µl:aan 1 x PBS-liuosta ja vorteksoitiin yhden minuutin ajan. Solususpensio siirrettiin ultrasentrifugiputkiin, jotka tasapainotettiin analyysivaa'alla. Putkia sentrifugoitiin ultrasentrifugilla 100 000 x g, 1,5 h, + 4 °C:ssa (Beckman Coulter Optima MAX-XP Ultrasentrifuge, roottori Beckman TLA-55). Tämän jälkeen supernatantti pipetoitiin pois ja pelletit liuotettiin 40 µl:aan 1 x PBS-liuosta ja vorteksoitiin hyvin.

Verihiutaleiden tuottamien EV:den ja plasma-EV:den eristämiseksi plasmasta poistettiin ensin verihiutaleet sentrifugoimalla verihiutaleplasma 50 ml:n Falcon-putkissa ilman jarrua 1600 x g, 20 minuuttia, RT (Eppendorf Centrifuge 5702 R). Sentrifugointi suoritettiin neljä kertaa siirtämällä aina supernatantti uuteen Falcon-putkeen. Tämän jälkeen saatu supernatantti suodatettiin hitaasti 0,45 µm:n ruiskusuodattimella uuteen putkeen ja laimennettiin 1:1:een käyttäen 1 x PBS-liuosta. EV:t eristettiin sentrifugoimalla ultrasentrifugilla 100 000 x g, 2 h, + 4 °C:ssa (Beckman Coulter Optima LE-8K Ultrasentrifuge, roottori S/N 15U4218 TYPE 50,2 Ti). Saadut pelletit liuotettiin 500 µl:aan 1 x PBS-liuosta ja vorteksoitiin hyvin.

4.3 Karakterisointi

4.3.1 Western Blot

PNT2- ja PC3-solujen tuottamia EV:tä karakterisoitiin tutkimalla sisältävätkö ne TSG101 ja CD9 -proteiineja Western Blot -menetelmällä. EV-näytteiden sisältämät proteiinit eroteltiin SDS-PAGE -ajolla. Ajossa käytettiin itsevalmistettuja akryyliamidigeelejä, joiden akryyliamidipitoisuudet olivat 8 % (kokoojageeli) ja 12 % (erottelugeeli). Näytteistä val-

mistettiin Laemmli-lysaatit, jotka pipetoitiin geelikaivoihin, taulukon 1 mukaisesti. Käytettyjen näytteiden pipetoitava määrä laskettiin siten, että jokaisessa näytteessä oli EV:tä 10^{10} partikkelia.

Taulukko 1. SDS-PAGE -ajossa käytettyjen Laemmli-lysaattien valmistuksessa tarvittavat näyte-, puskuri- ja Laemmli-puskurimäärät.

Näyte-ID	Näyte (µl)	Puskuri (PBS) (µl)	6 x LB (µl)
PC3 EXO 3D	3,7	36,3	7
PC3 MV 3D	7,1	32,9	7
PC3 EXO6 2D	5,64	34,36	7
PC3 MV6 2D	16,4	23,6	7
PNT2 E3 3D	1,75	38,25	7
PNT2 M3 3D	2,1	37,9	7
PNT2 EXO 2D	15,9	24,1	7
PNT2 MV 2D	18,5	21,5	7

Molekyylipainostandardina käytettiin PageRuler Plus Prestained Protein Ladder -markkeria (ThermoFisher Scientific). CD9-proteiinin koko on noin 25 kDa ja TSG101-proteiinin noin 47 kDa. SDS-PAGE -ajoaika oli 90 minuuttia 110 V:n jännitteellä. Ajon jälkeen geelille syntyneet proteiinivyöhykkeet siirrettiin PVDF-membraanille blottaamalla 100 V:n jännitteellä 90 minuutin ajan. Tämän jälkeen PVDF-membraani blokattiin 5 %:lla maito-TBS-T -seoksella (1 h, RT) epäspesifisen vasta-ainesitoutumisen välttämiseksi.

Proteiinien paikantamiseksi membraanilta käytettiin primäärivasta-aineena sekä CD9-että TSG101-vasta-aineita, joista tehtiin laimennokset 1:400 TBST-T-liuokseen. PVDF-membraania inkuboitiin vasta-aineessa + 4 °C:ssa yön yli. Inkuboinnin jälkeen membraani pestiin ravistelussa TBS-T -liuoksella kolme kertaa 15 minuuttia. Pesun jälkeen lisättiin HRP-konjugoitu sekundäärinen vasta-aine, anti-mouse IgG (1:2000), ja membraania inkuboitiin 2 h huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen membraani pestiin jälleen ravistelussa TBS-T -liuoksella kolme kertaa 15 minuuttia. Proteiinivyöhykkeiden detektointia varten membraanille lisättiin ECL-substraattia ja sitä inkuboitiin 5 minuuttia huoneenlämmössä. Membraani kuvattiin kemiluminesenssikameralla (Fujifilm LAS-3000 Imaging system).

4.3.2 NTA-mittaus

Eristettyjen EV:den konsentraatiot ja kokojakaumat mitattiin nanopartikkelien jäljitysanalyysillä (engl. *Nanoparticle Tracking Analysis* NTA). Koska NTA-metodi perustuu valon

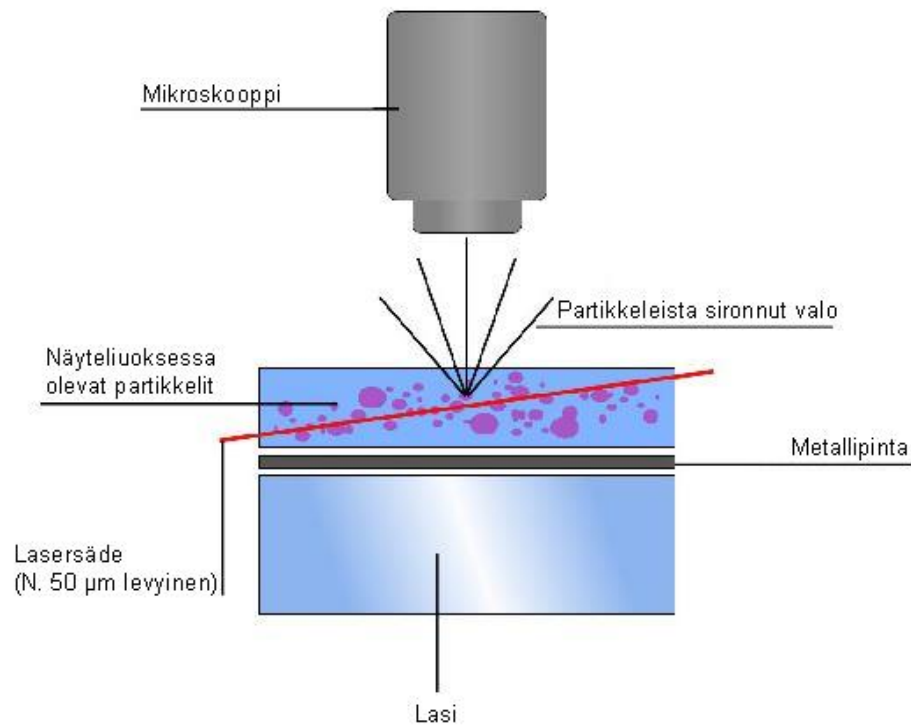
sirontaan näyteliuoksessa olevista partikkeleista sekä Brownin liikkeeseen (satunnainen lämpöliike) nesteessä, PNT2-EV -näytteistä tehtiin laimennokset 1:500 ja 1:250 ja plasma-EV -näytteistä 1:10 000 0,1 μm :n ruiskusuodattimella suodatettuun Milli-Q-veetee. Plasma-EV -näytteissä oletettiin olevan enemmän mitattavia partikkeleja.

NTA-mittaus suoritettiin Nanosight LM14 -laitteella (sininen laser: 404 nm, 70 mW, kamera: SCMOS). Näytekammio pestiin ennen mittausta Milli-Q-vedellä ja 70 % etanolilla ja kuivattiin paineilmalla. Samanlainen pesu tehtiin jokaisen mitattavan näytteen välillä. Tausta mitattiin partikkelivapaalla Milli-Q-vedellä. EV-näytteet vorteksoitiin hyvin ennen jokaista mittausta. Näyte asetettiin näytekammioon ruiskulla (kuva 10).



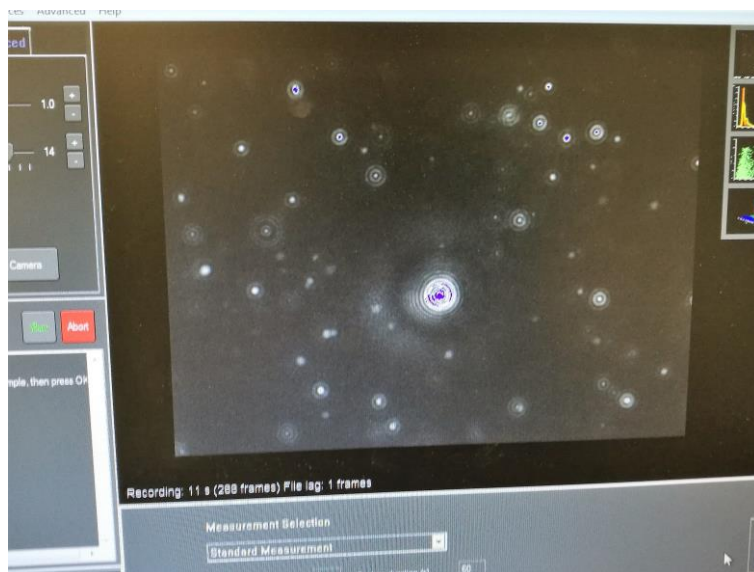
Kuva 10. Mitattava näyte on asetettu näytekammioon. Kuva Saara Kauremaa.

Mitattavat EV-partikkelit olivat näytekammiossa liuoksessa, jonka läpi lasersäde johdettiin. Tällöin lasersäteen aiheuttama valon sironta jokaisesta partikkelista havaittiin mikroskoopilla, johon oli liitetty videokamera. Kuva 11.



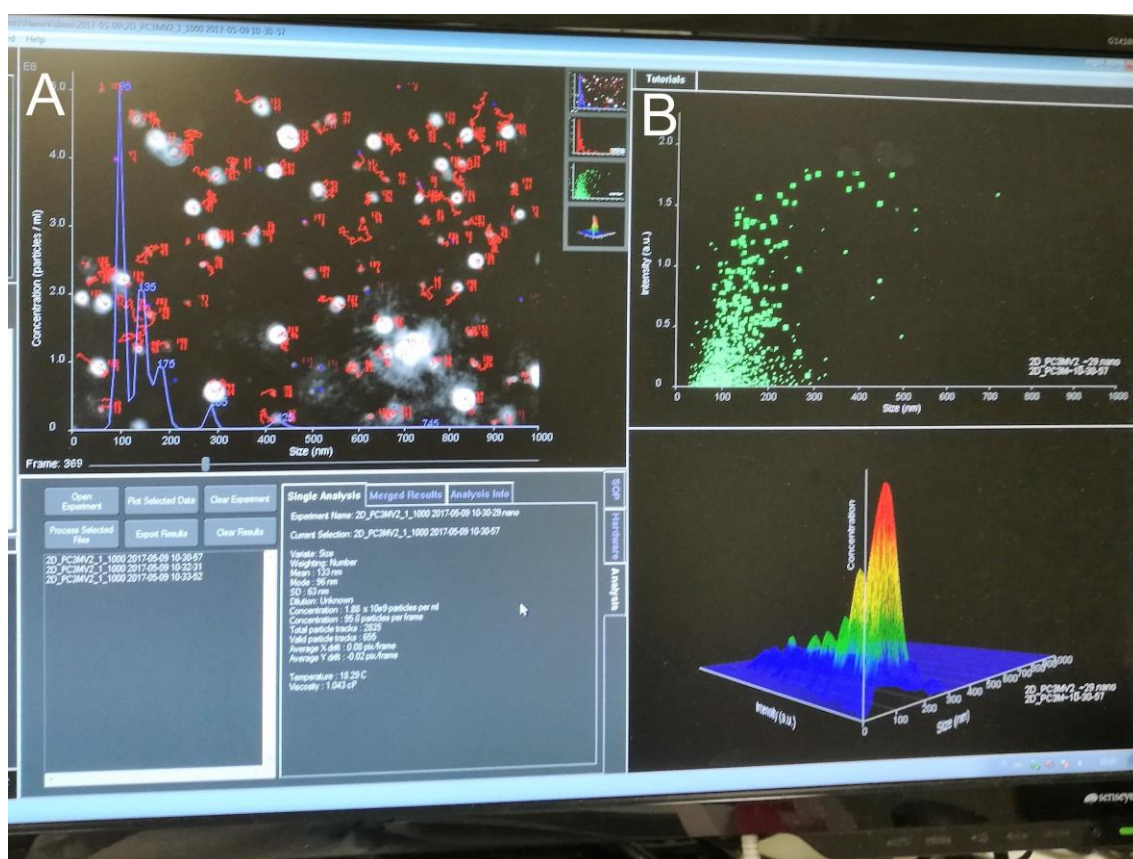
Kuva 11. NTA-mittauksen toimintaperiaate [25, muokattu].

Jokainen EV-näytteen mittausta koostui kolmesta 60 sekunnin videoidusta mittauksesta. Näytön vahvistus asetettiin arvoon 1.0 ja kameran taso arvoon 14, millä todettiin kuvien laadun olevan riittävä partikkelien havaitsemiseksi. Kuva 12.



Kuva 12. Mittauksen aikana EV:t näkyvät vaaleina pisteinä ruudulla. Kuva Saara Kauremaa.

Näytettä sekoitettiin ruiskun avulla jokaisen 60 sekunnin videon välissä. EV:t liikkuvat mittauksissa Brownin liikkeen mukaan kokonsa määrittelemällä nopeudella. Pienet partikkelit liikkuvat nopeammin ja kauemmaksi kuin suuret partikkelit. Mittauksen jälkeen laitteen data analysoitiin NanoSight NTA 3.0 -ohjelmalla (näytön vahvistus 10, detektoinnin raja-arvo 5), joka prosessoi videot jäljittämällä kuvan kuvalta ja määritti partikkelien keskimäärin liikkuman matkan. Kuva 13A. Matkan avulla ohjelma määritti jokaiselle partikkelille hajaantumiskvontion (engl. *Diffusion Coefficient*), jonka avulla, näytenesteen viskositeetin ja lämpötilan ollessa tiedossa, ohjelma pystyi laskemaan partikkelin hydrodynaamisen läpimitan (engl. *Hydrodynamic Diameter*) käyttäen Stokes-Einsteinin kaavaa ja näin ollen määrittämään EV:den kokojakauman (kuva 13B).

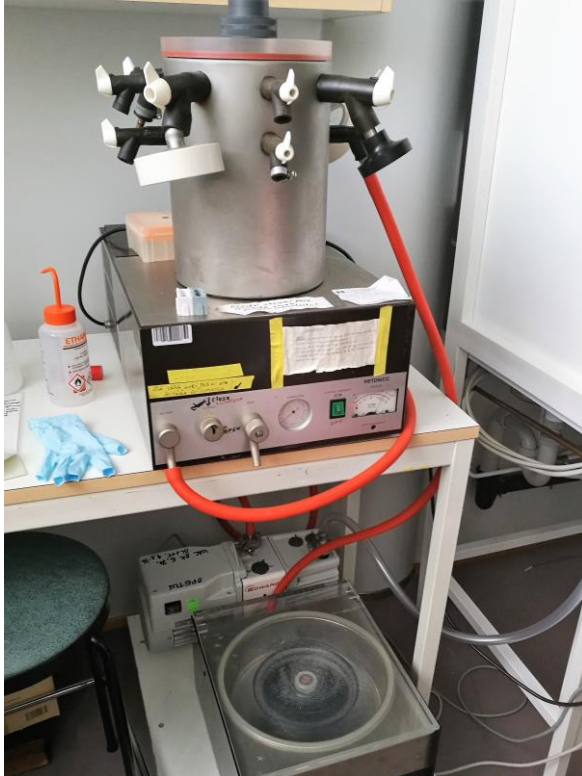


Kuva 13. EV-partikkelien liikkuma matka jäljitetään (A) ja niiden kokojakauma saadaan selville hydrodynaamisen läpimitan avulla (B). Kuva Saara Kauremaa.

Laitteen ohjelma laski myös mitatuista EV-näytteistä keskimääräisen partikkelien määrän ja määritti näytteiden konsentraation.

4.4 Lyofilisaatio

Lyofilisaatiossa eli kylmäkuivauksessa EV-näytteistä poistettiin PBS-liuos sublimaatiolla. Kuivaus tehtiin Hetosicc HT50 -kylmäkuivaajalla, johon oli yhdistetty Hetovac-vakuu-
misentrifugi (kuva 14).



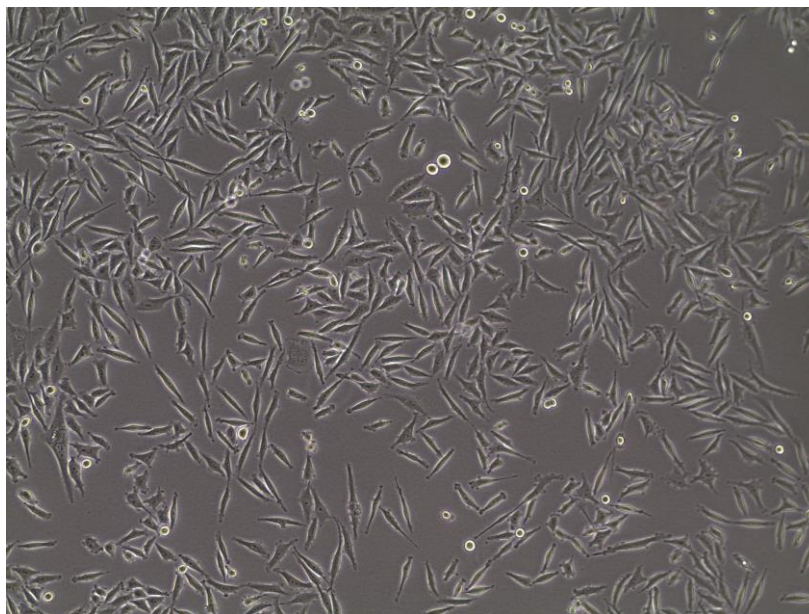
Kuva 14. Pöydällä olevaan Hetosicc-kylmäkuivaajaan on yhdistetty Hetovac-vakuu-
misentrifugi (pöydän alla). Kuva Saara Kauremaa.

Kuivattavia EV-näytteitä sentrifugoitiin, kunnes neste oli sublimoitunut näyteputkista
pois. Näytteet säilöttiin tämän jälkeen jääkaappiin + 4 °C:seen.

4.5 Saatujen vesikkelien sisäänotto soluihin

Työssä tehtiin sekä PNT2-solujen tuottamien EV:den että plasma-EV:den sisäänotto so-
luihin, mutta työn laajuuden vuoksi tässä käsitellään sisäänottoa vain plasma-EV:den
osalta.

Soluihin sisäänottoa varten laitettiin PC3-soluja (kuva 15) peitinlevyille kasvamaan. Solut jaettiin ensin 1:5 jaolla käyttäen DMEM/F12 -kasvatusmediumia (Gibco, LOT 1838053, exp. 30.11.2017), johon oli lisätty 10 % EV-depletoitua seerumia (FBS), 1 % L-glutamiinia (L-Glutamine 200 mM, Gibco) ja antibiootteja (1 % penisilliini/streptomysiini).



Kuva 15. Konfluenssin ollessa 70–80 % PC3-solut voidaan laittaa peitinlevylle vuorokaudeksi kasvamaan. Kuva Saara Kauremaa.

Peitinlevyt laitettiin kahdelle 24-kuoppalevyille kahdeksaan kuoppaan. Solususpensiota pipetoitiin 500 µl / kuoppa peitinlevyjen päälle. Soluja kasvatettiin + 37 °C:ssa, 5 % CO₂:ssa inkubaattorissa seuraavaan päivään.

4.5.1 EV:den leimaus

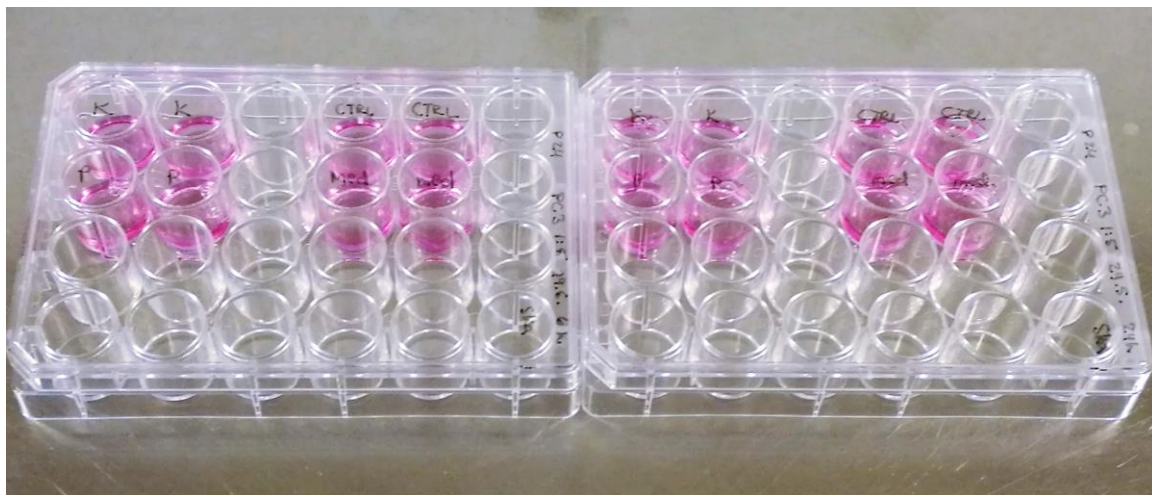
Leimausta varten pakastetun ja lyofilisoidun plasma-EV -näytteiden konsentraatiot määritettiin NTA-menetelmällä. Lyofilisoitu EV-näyte liuotettiin 100 µl:aan partikkelivapaaseen Milli-Q -veteen. Molemmista näytteistä tehtiin NTA-mittauksia varten laimennokset 1:10 000 partikkelivapaaseen Milli-Q -veteen. Mittauksen jälkeen näytteistä tehtiin leimattavat näytteet (100 µl) konsentraatioon 1×10^{12} partikkelia / ml, sillä leimaus tulee tehdä mahdollisimman konsentroiduille näytteille. Valmistettiin leimaväri (SP-DiOC18(3), Invitrogen, LOT 1793812) vorteksoimalla sitä 15 minuuttia värisaostumien poistamiseksi. Leimaväri suodatettiin 0,2 µm ruiskusuodattimella. Näytteisiin laitettiin väriä suhteessa 1:2000. Leimaväristä tehtiin välilaimennos 1:200 partikkelivapaaseen 1 x PBS-liuokseen

(suodatettu 0,22 μm suodattimella), josta pipetoitiin leimattaviin näytteisiin 0,5 μl väriä. Samalla valmistettiin leimakontrollinäyte pipetoimalla 0,5 μl leimaväriä 100 μl :aan partikkelivapaata 1 x PBS-liuosta. Näytteitä inkuboitiin 20 minuuttia + 37 °C:ssa blokki-inkubaattorissa.

Inkuboinnin jälkeen näytteet ja leimakontrolli puhdistettiin ylimääräisistä väripartikkeleista sentrifugoimalla. Näytteiden ja kontrollin joukkoon lisättiin 650 μl partikkelivapaata 1 x PBS-liuosta ultrasentrifugointiin tarvittavan volyymin saavuttamiseksi. Putket tasapainotettiin analyysivaa'alla. Putkia sentrifugoitiin 70 minuuttia, 110 000 x g, + 21 °C (Beckman Coulter Optima MAX-XP Ultrasentrifuge, roottori Beckman TLA-55).

4.5.2 Takaisinotto soluihin

Puhdistuksen jälkeen näytteiden EV-pitoisuudet mitattiin NTA-menetelmällä. Supernatantti poistettiin ja EV-pelletit liuotettiin 100 μl :aan partikkelivapaata 1 x PBS-liuosta. Konsentraatiomäärittystä varten näytteistä tehtiin laimennokset 1:50, jotka mitattiin. EV-näytteistä ja leimakontrollista tehtiin soluille vientiä varten laimennokset konsentraatioon 2×10^{10} partikkelia / ml. 24-kuoppalevyiltä poistettiin 300 μl mediumia ja niihin lisättiin kuvan 16 mukaisesti 200 μl näytettä, leimakontrollia ja kasvatusmediumia negatiiviseksi kontrolliksi.



Kuva 16. 24-kuoppalevyille on lisätty EV-näytteet ja kontrollit. K = lyofilisoitu plasma-EV -näyte, P = pakastettu plasma-EV -näyte, CTRL = leimakontrolli ja MED = negatiivinen kontrolli. Kuva Saara Kauremaa.

Sisäänottoa soluille tarkasteltiin kahden aikapisteen avulla: 6 h ja 24 h. Soluja kasvatettiin + 37 °C:ssa, 5 % CO₂:ssa inkubaattorissa aikapisteiden saavuttamiseksi.

4.5.3 Mikroskopointi

Solujen kykyä ottaa EV:tä sisäänsä tarkasteltiin fluoresenssimikroskoopilla. 24-kuoppalevyt otettiin pois inkubaattorista 6 ja 24 tunnin kuluttua. Kasvatusmedium poistettiin kuopista ja solut pestiin kolme kertaa 0,5 ml:lla 1 x PBS-liuosta. Tämän jälkeen solujen normaali hajoaminen pysäytettiin pipetoimalla kuoppiin 400 µl 4 % PFA-liuosta ja inkuboimalla 10 minuuttia, RT. Inkuboinnin jälkeen solut pestiin kaksi kertaa 0,5 ml:lla 1 x PBS-liuosta. Pesun jälkeen solut värjättiin PBS-liuokseen lisätyllä (1:500) tumavärillä (Hoechst, Invitrogen, LOT 1293080) pipetoimalla väriliuosta 400 µl / kuoppa. Inkuboitiin 10 minuuttia, RT. Ylimääräinen väri pestiin pois 0,5 ml:lla 1 x PBS-liuosta kolme kertaa 10 minuutin vaikutusajalla taustan hälventämiseksi. Tämän jälkeen peitinlevyt kiinnitettiin (engl. *Mounting*) preparaattilevyille kiinnitysaineella (Mowiol 4-88, Sigma-Aldrich, LOT #STBF7179V, joka sisälsi 2,5 % DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane, Sigma-Aldrich, LOT #WXBC2274V)). Näytteet ja kontrollit kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla (EVOS AMG Fluorescence Microscope) 20-kertaisella suurennoksella. Mikroskopoinnin jälkeen kuvat käsiteltiin ImageJ-kuvankäsittelyohjelmalla.

4.6 Proliferaatiokoe

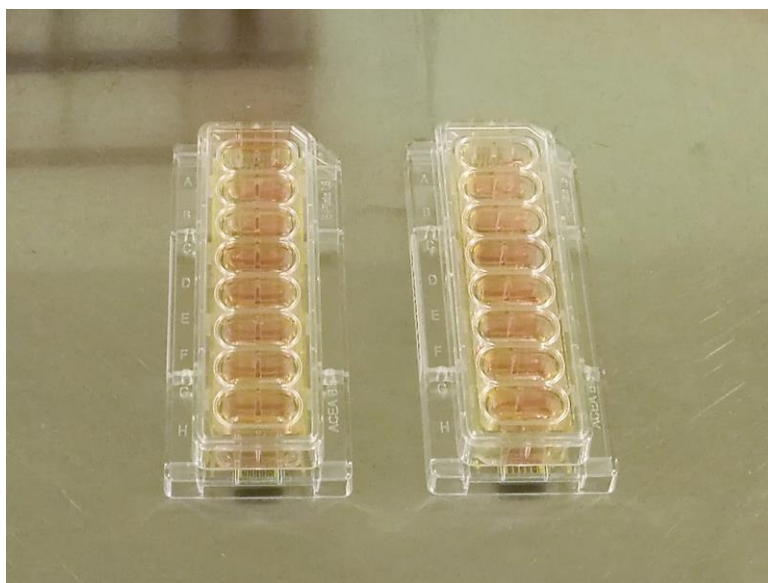
Työssä tarkasteltiin myös lyofilisoitujen EV:den vaikutusta solujen proliferaatioon RTCA iCELLigence -laitteistolla. Se käsittää iCELLigence-laitteen, jossa on paikka kahdelle sensoroidulle mittauslevylle (E-Plate L8 Device) sekä ohjelmiston iPad-laitteella, joka on langattomasti yhteydessä iCELLigence-laitteeseen.

iCELLigence-laitteen annettiin ensin lämmetä inkubaattorissa (+ 37 °C, 5 % CO₂) kahden tunnin ajan. Tarkistettiin, että langaton yhteys toimii laitteen ja iPadin välillä. Määriteltiin ohjelmaan mittauksessa tarvittavat tiedot ja näytteiden paikat mittauslevyillä (taulukko 2).

Taulukko 2. Proliferaatiokokeessa käytetyt näytteet ja kontrollit mittauslevyillä.

E-Plate 1		E-Plate 2	
A	PC3 20 000	A	PC3 20 000
B	PC3 + PFP EV 10^7	B	PC3 + PFP EV 10^{10}
C	PC3 + PFP EV lyoph. 10^7	C	PC3 + PFP EV lyoph. 10^{10}
D	Medium	D	PC3 + PFP EV lyoph. 10^{12}
E	PC3 20 000	E	PC3 20 000
F	PC3 + PFP EV 10^7	F	PC3 + PFP EV 10^{10}
G	PC3 + PFP EV lyoph. 10^7	G	PC3 + PFP EV lyoph. 10^{10}
H	PC3 20 000	H	PC3 + PFP EV lyoph. 10^{12}

Mittauslevyjen kaivoihin pipetoitiin 150 μ l DMEM/F12 -kasvatusmediumia ja levyjä inkuboitiin 30 minuuttia, + 37 °C, 5 % CO₂. Tarvittavat PC3-solut laskettiin Bürkerin kammiolla. Solumääräksi saatiin $6,4 \times 10^4$ solua / ml. Koska mittaukseen haluttiin 20 000 solua / kaivo, tarvittiin soluja 31 μ l / kaivo. Tehtiin yksi solususpensio, josta solut pipetoitiin levyille. Solususpensiota sekoitettiin hyvin pipetoimalla sitä edestakaisin jokaisen kaivon laiton välissä tasaisen lopputuloksen saamiseksi. Solujen annettiin asettua 30 minuutin ajan huoneenlämmössä. Kuva 17.



Kuva 17. iCELLigence-laitteeseen asetettavat sensoroidut mittauslevyt. Kaivoissa solujen tulee koskettaa kaivon pohjalla olevaa sensoripintaa mittauksen onnistumiseksi. Kuva Saara Kauremaa.

Proliferaatiokokeessa käytettyjen lyofilisoitujen ja pakastettujen plasma-EV-näytteiden (PFP) konsentraatiot määritettiin NTA-mittauksella. Koska kokeessa tarkasteltiin eri EV-pitoisuuksien vaikutusta proliferaatioon, näytteistä tehtiin mitattujen konsentraatioiden

perusteella tarvittavat laimennokset, jotta voitiin laskea soluille pipetoitava määrä haluttuihin EV-pitoisuuksiin pääsemiseksi (taulukko 3). Solujen asettumisen jälkeen niiden joukkoon pipetoitiin taulukon 3 mukaiset määrät kyseisiä EV:tä mittauslevyille määriteltujen paikkojen mukaisesti (taulukko 2).

Taulukko 3. Proliferaatiokokeessa mittauslevyille pipetoidut EV-määrät.

EV-pitoisuus soluilla (solua / ml)	EV:tä soluille (μl)	EV:tä soluille (μl)	EV:tä soluille (μl)	EV:tä soluille (μl)	EV:tä soluille (μl)
	PFP EV Pakastettu c = $6,85 \times 10^{12}$ / ml	PFP EV Pakastettu c = $6,85 \times 10^9$ / ml	PFP EV Lyoph. c = $1,08 \times 10^{13}$ / ml	PFP EV Lyoph. c = $1,08 \times 10^{10}$ / ml	PFP EV Lyoph. c = $1,08 \times 10^9$ / ml
10^7		1,5			9,3
10^{10}	1,5			1	
10^{12}			92,6		

Näytteen vähyden vuoksi EV-pitoisuuden 10^{12} soluille pipetoitava määrä oli vain 50 μl eli reilu puolet laskennallisesta määrästä. Solukontrollina käytettiin PC3-soluja, joiden joukkoon ei ollut lisätty EV:tä. Negatiivisena kontrollina käytettiin kasvatusmediumia, jolla mitattiin tausta ennen varsinaisen mittauksen käynnistystä. Mittauslevyt asetettiin iCELLigence-laitteeseen inkubaattoriin + 37 °C, 5 % CO₂ (kuva 18).



Kuva 18. iCELLigence-laite on pyyhitty 70 % etanolilla ja asetettu inkubaattoriin odottamaan mittauksen käynnistystä. Kuva Saara Kauremaa.

Laitteen ollessa inkubaattorissa mittausohjelma käynnistettiin iPadista. Mittauslevyjen pohjassa olevat mikroelektroniset sensorit mittaavat virtapiirin impedanssia, joka määräytyy solujen elinkelpoisuudesta, solumäärästä, solujen morfologiasta ja adheesioasteesta. Mittauksen etenemistä seurattiin iPadin näytöltä reaaliaikaisesti tietyn väliajoin. Mittauksen annettiin olla päällä hieman yli neljä vuorokautta, jonka jälkeen tulokset analysoitiin ja luettiin ohjelmiston avulla.

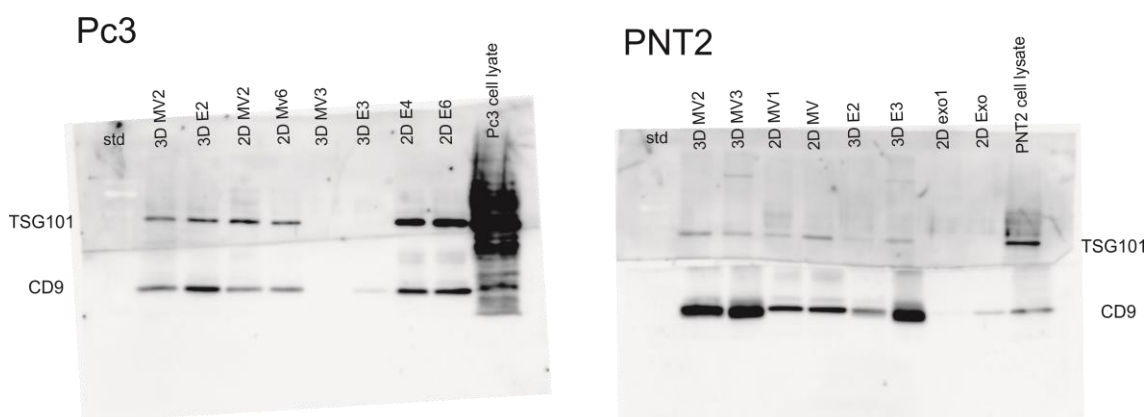
5 Tulokset

5.1 Karakterisoinnin tulokset

Karakterisoinnilla havaittiin PNT2- ja PC3-solujen sekä verihitaleiden tuottaneen sekä eksosomeja että mikrovesikkeleitä. NTA-mittauks tulokset ovat liitteessä 1.

5.1.1 Western Blot -menetelmän tulokset

Western Blot -detektointimenetelmä todisti PC3- ja PNT2-solunäytteistä eristettyjen EV-näytteiden sisältävän EV:tä käytettäessä markkereina sekä sytoplasmaproteiinia (TSG101) että membraaniproteiinia (CD9) (kuva 19).



Kuva 19. CD9- ja TSG101-proteiinimarkkerit toimivat positiivisena kontrollina PC3- ja PNT2-solunäytteistä eristetyille EV:lle. 12 % akryyliamidigeeli, membraanit on kuvattu kemiluminesenssikameralla.

Tämän työn kannalta merkittävät näytevyöhykkeet kuvassa 19 ovat 2D-näytteiden antamat vyöhykkeet. Kemiluminisenssikameralla kuvattaessa näytevyöhykkeet tarvitsivat pidemmän valotusajan, jolloin markkerivyöhykkeet ylivalottuivat.

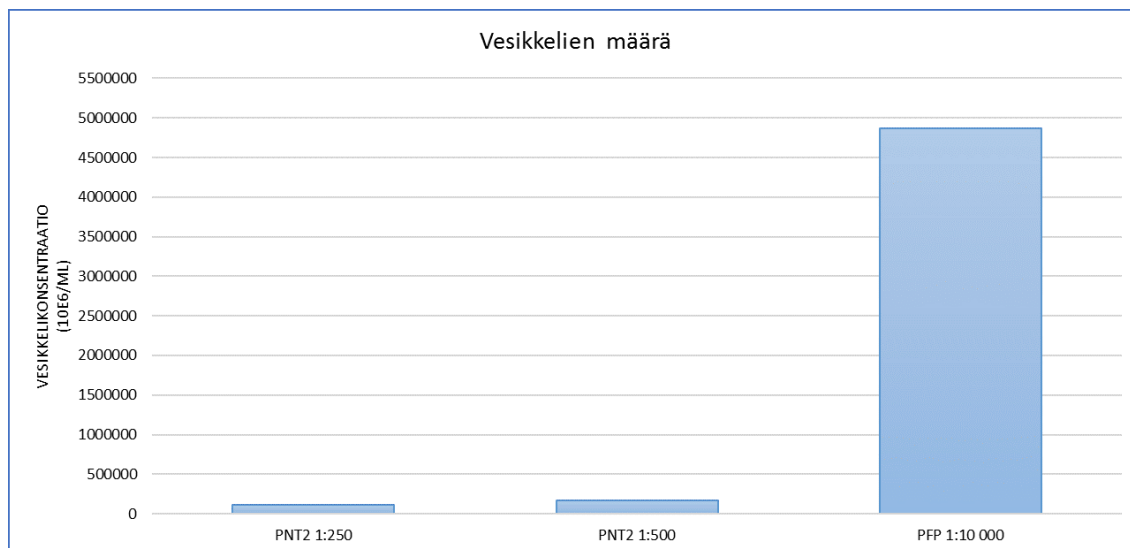
5.1.2 NTA-mittaustulokset

PNT2-solujen ja verihiutaleiden tuottamien EV:den pitoisuudet vesikkelien eristykseen jälkeen ovat taulukossa 4.

Taulukko 4. Plasmasta saadaan eristettyä huomattavasti enemmän EV:tä (PFP EV) kuin PNT2-solut olivat tuottaneet (PNT2 EV).

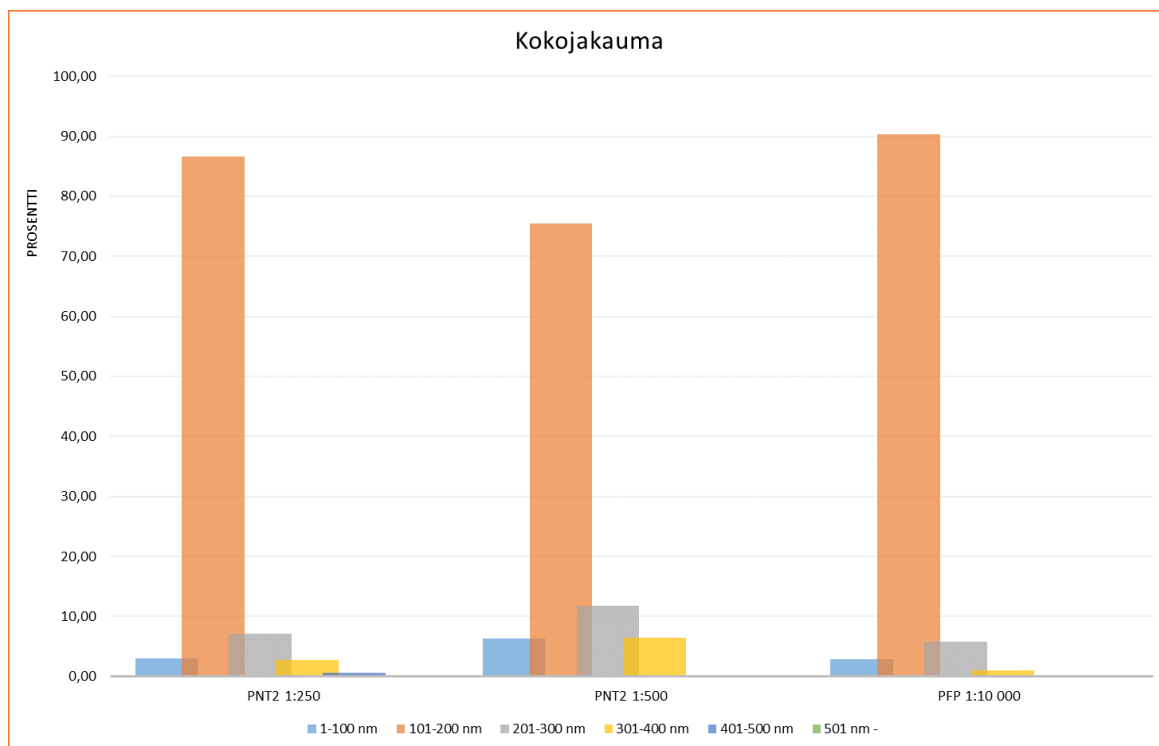
Laimennos	PNT2 EV c (partikkelia / ml)	PFP EV c (partikkelia / ml)
1:250	$1,16 \times 10^{11}$	
1:500	$1,73 \times 10^{11}$	
1:10 000		$4,86 \times 10^{12}$

Kuva 20 havainnollistaa sitä, että työssä saatiin eristettyä plasmasta moninkertaisesti EV:tä verrattuna PNT2-solujen tuottamiin EV:hin.



Kuva 20. PNT2-solujen tuottamien EV:den määrä verrattuna verihiutaleiden tuottamiin EV:hin.

Verihiutaleet tuottavat enemmän EV:tä, kuin PNT2-solut lyhyessä ajassa. Sen sijaan EV-populaatiossa ei ollut suuria eroavaisuuksia tarkastellessa PNT2-solujen ja verihiutaleiden erittämiä EV:tä (kuva 21).



Kuva 21. Eristettyjen EV:den kokojakauma. Eksosomit: sininen pylväs, mikrovesikkelit: oranssi, harmaa ja keltainen pylväs.

Voidaan todeta, että suurin osa eristetyistä EV:stä oli mikrovesikkeleitä. Myös pieniä eksosomeja esiintyi näytteissä. Sen sijaan apoptooppisia vesikkeleitä (> 500 nm) ei näytteissä esiintynyt, mikä oli tarkoituskin.

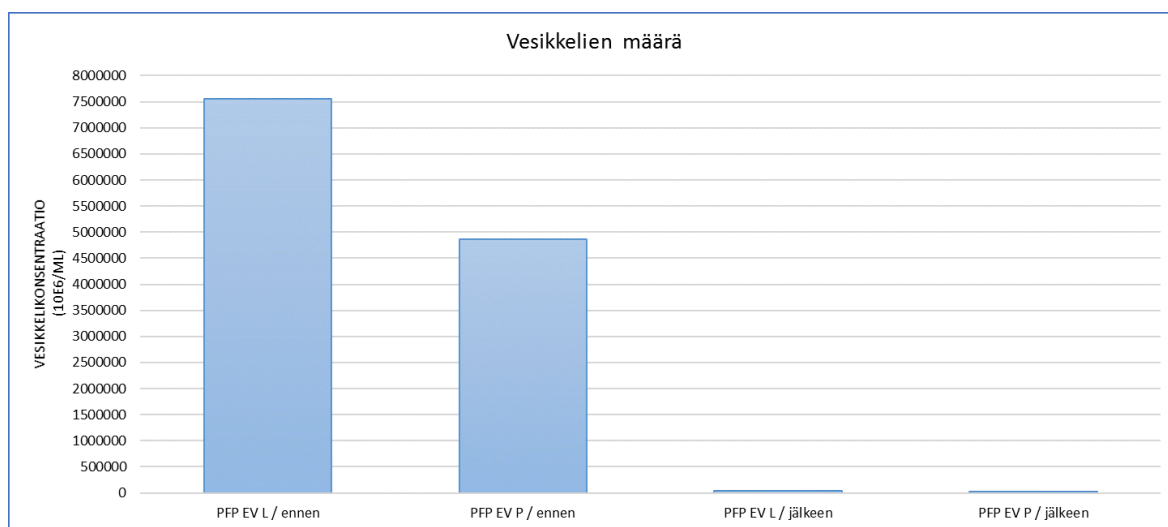
Verrattaessa lyofilisoidun ja pakastetun verihiutale-EV-näytteiden EV-pitoisuuksia havaittiin, että lyofilisoitu näyte sisälsi hieman enemmän partikkeleita, kuin pakastettu näyte (taulukko 5).

Taulukko 5. Lyofilisoitu EV-näyte (PFP EV L) sisälsi enemmän partikkeleita, kuin pakastettu näyte (PFP EV P) sekä ennen leimausta, että puhdistuksen jälkeen.

	PFP EV L c (partikkelia / ml)	PFP EV P c (partikkelia / ml)
Ennen väriaineleimausta	$7,55 \times 10^{12}$	$4,86 \times 10^{12}$
Väriainepuhdistuksen jälkeen	$3,38 \times 10^{10}$	$2,48 \times 10^{10}$

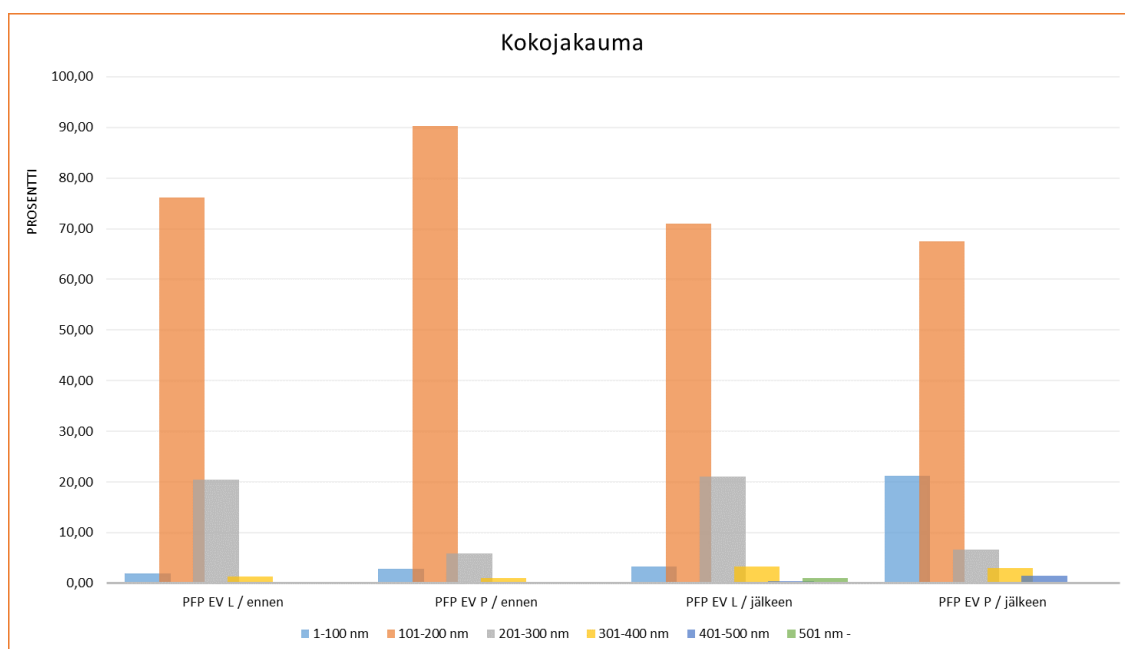
Voidaan myös todeta, että väriaineella leimattujen näytteiden puhdistus ylimääräisestä väriaineesta vähensi samassa suhteessa EV:den määrää näytettä kohden (taulukko 5). Kuvasta 22 havaitaan, että puhdistuksessa menetetään prosentuaalisesti paljon EV:tä,

mutta puhdistus on tärkeä tehdä taustan eliminoimiseksi fluoresenssimikroskooppikuvaussessa.



Kuva 22. Ylimääräisen fluoresoivan väriaineen poistaminen vähentää EV:den määrää huomattavasti käytettäessä sekä lyofilisoituja että pakastettuja EV-näytteitä.

EV-populaatiojakaumaan EV:hin sitoutumattoman väriaineen pesu ei juurikaan vaikuttanut (kuva 23).

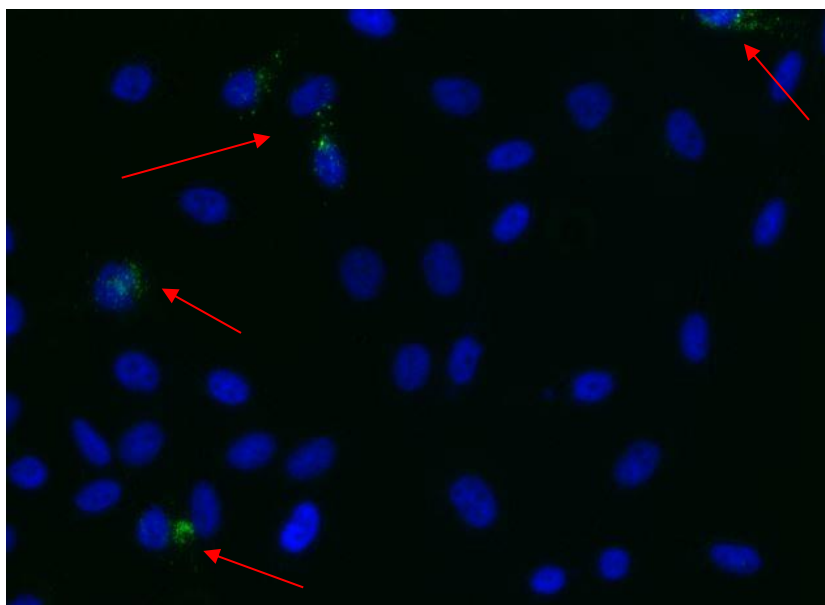


Kuva 23. Lyofilisoidun ja pakastetun verihiutale-EV-näytteiden EV-kokojakauma. Eksosomit: sininen pylväs vasemmalla, mikrovesikkelit: oranssi, harmaa, keltainen ja sininen (oikealla) pylväs.

Mikrovesikkeleitä esiintyi prosentuaalisesti eniten. Eksosomeja löytyi myös kaikista näytteistä. Sen lisäksi pesun jälkeiset näytteet sisälsivät hieman isompia partikkeleita, kuin mikrovesikkelit ja eksosomit ovat.

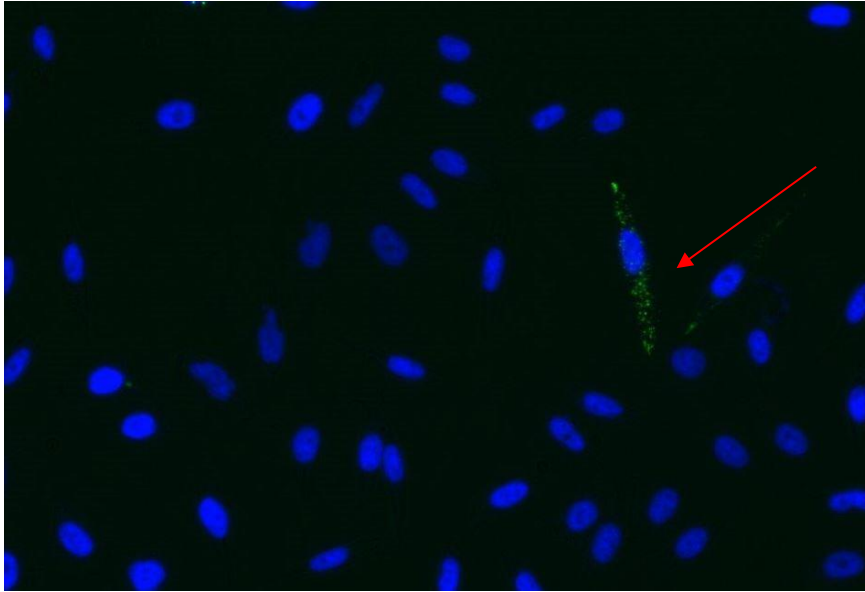
5.2 Mikroskopointitulokset

Fluoresenssimikroskoopilla kuvattaessa huomattiin pakastettujen verihiutale-EV:den (kuva 24) löytäneen solujen sisään paremmin kuin lyofilisoitujen EV:den (kuva 25).



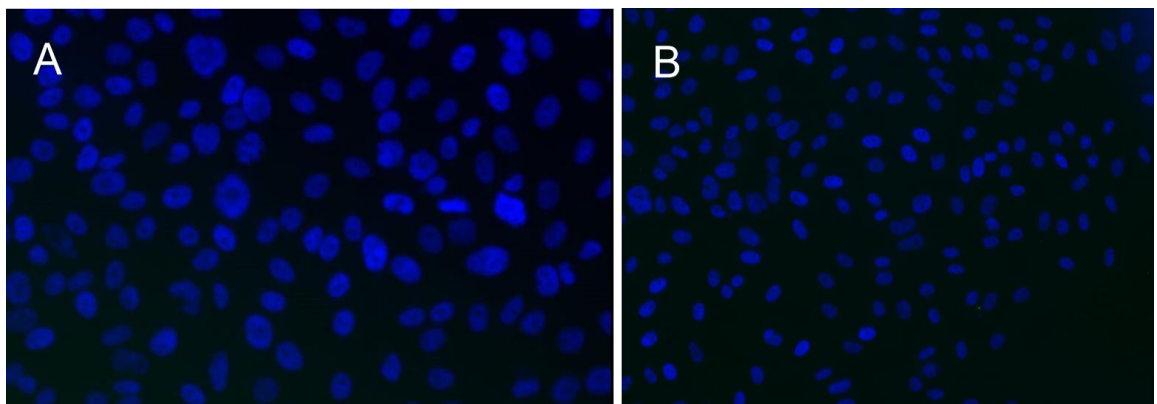
Kuva 24. Esimerkkikuva pakastettujen verihiutale-EV:den sisäänotosta PC3-soluihin. Fluoresenssimikroskooppikuva Saara Kauremaa.

EV:t näkyvät kuvissa 24 ja 25 vihreinä pisteinä tuman lähetyvillä.



Kuva 25. Esimerkkikuva lyofilisoitujen verihiutale-EV:den sisäänotosta PC3-soluihin. Fluoresenssimikrooppikuva Saara Kauremaa.

Todettiin myös leimakontrollinäytteen ja negatiivisen kontrollinäytteen olevan puhtaita (kuva 26).

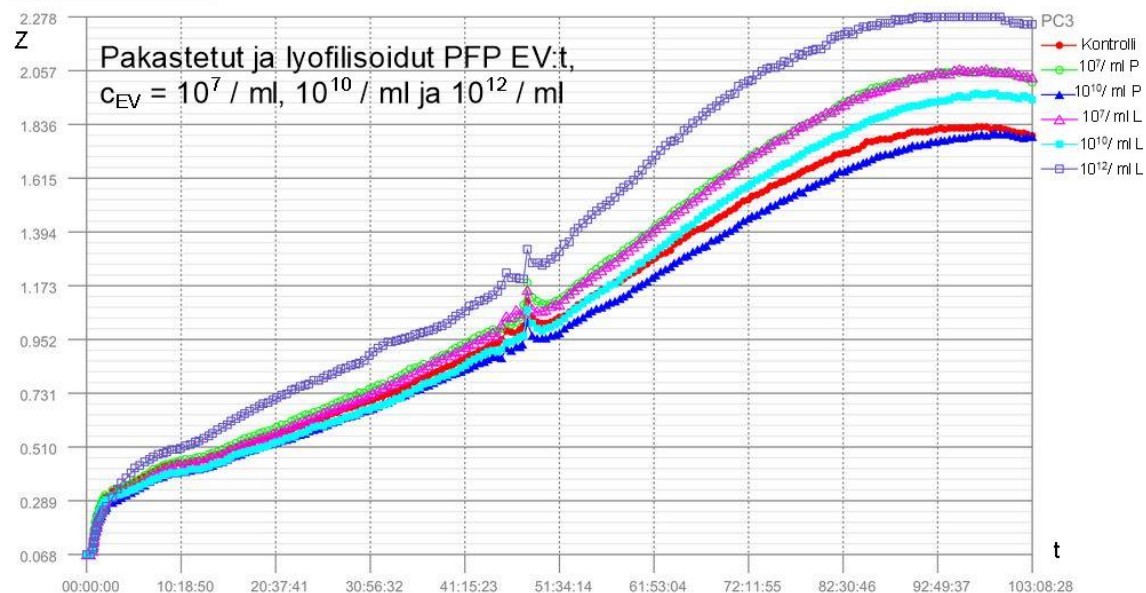


Kuva 26. Leimakontrollinäyte (A) ei sisältänyt EV:tä. Negatiivinen kontrolli (B) oli puhdas.

Tarkastellessa fluoresenssimikrooppilla solujen sisään ottamien EV:den määrää havaittiin sen olevan vähäistä. Kuuden tunnin inkubaation jälkeen solut olivat ottaneet EV:tä sisäänsä erittäin vähän ja vasta 24 tunnin inkubaation jälkeen saatiin parempia tuloksia.

5.3 Proliferaatiokokeen tulokset

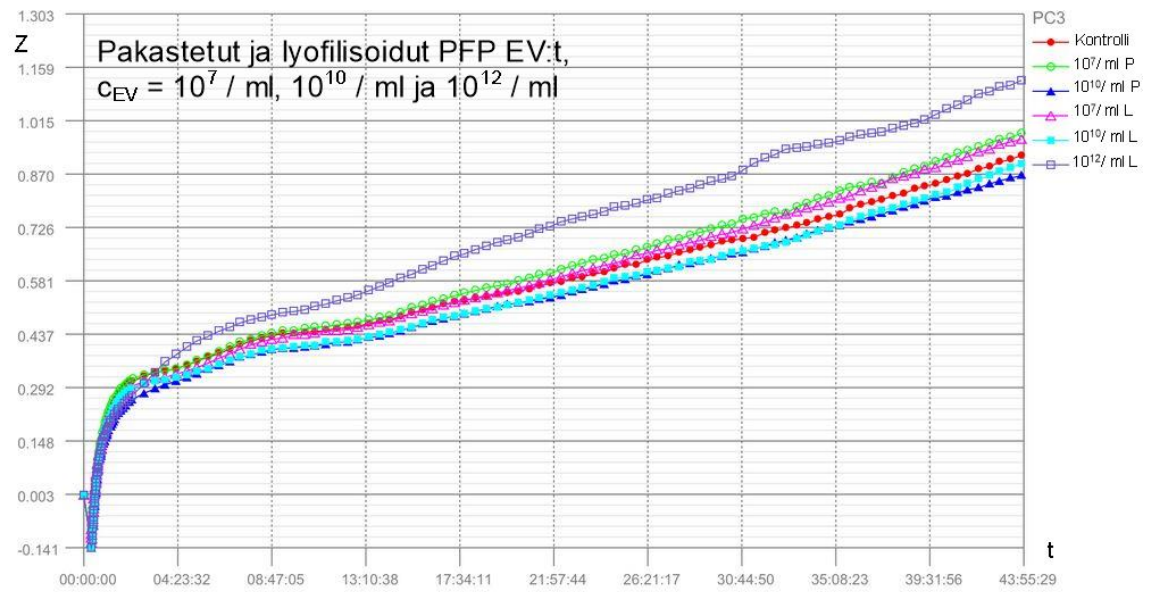
Proliferaatiokoe osoitti verihutale-EV:den vauhdittavan PC3-solujen kasvua (kuva 27). Kasvua osoittavissa kuvissa on esitetty iCELLigence-laitteen mittaamat rinnakkaisnäytteen impedanssien (Z) keskiarvot ajan funktiona.



Kuva 27. PC3-solujen proliferaatio kiihtyi eksponentiaalisen kasvun loppuvaiheessa, kun solujen joukkoon oli lisätty verihutale-EV:tä.

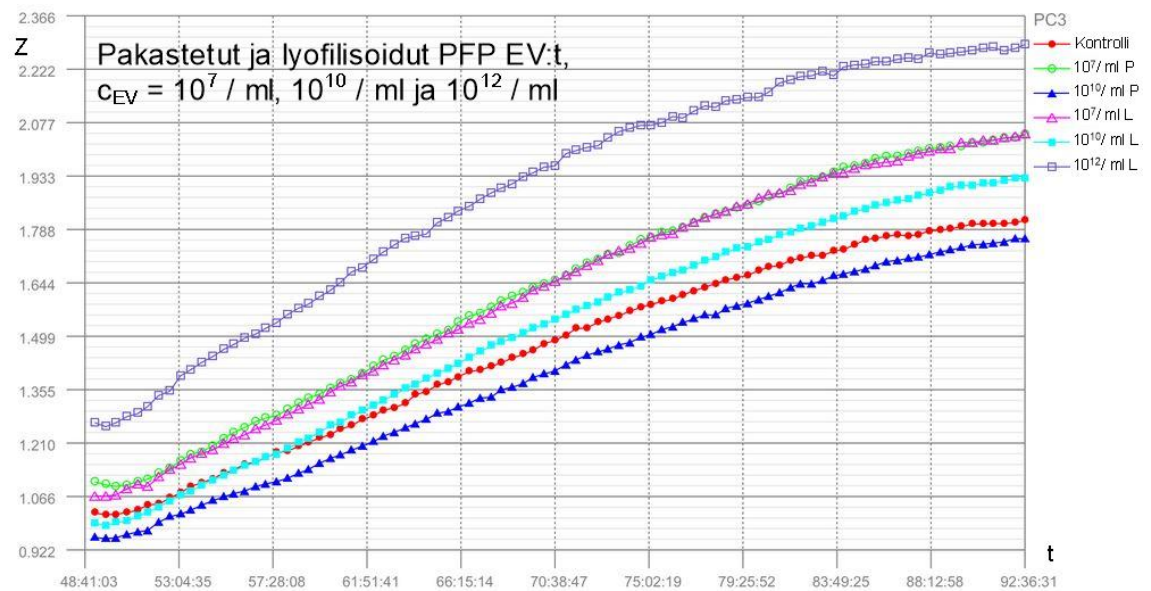
Ainoastaan pakastettujen verihutale-EV:den pitoisuudella $10^{10} / \text{ml}$ (sininen käyrä kuvassa 27) kasvu oli hitaampaa kuin kontrollisolujen kasvu (punainen käyrä kuvassa 27).

PC3-solut kasvavat suhteellisen hitaasti, joten varsinainen kasvu alkaa vasta 24 h kuluttua solujen asettamisesta kasvatusmediumiin. Tämä voidaan todeta kuvasta 28, sillä käyrät eivät poikkea alkuvaiheessa juurikaan toisistaan poikkeuksena lyofilisoitu EV-pitoisuus $10^{12} / \text{ml}$ (violetti käyrä).



Kuva 28. Lyofilisoidut EV:t pitoisuudessa $10^{12} / \text{ml}$ lisäsi PC3-solujen kasvua heti lag-vaiheen jälkeen.

Sen sijaan aktiivisen kasvun loppuvaiheessa EV:den vaikutus kasvuun lisäävästi näkyy selkeästi (kuva 29).



Kuva 29. Eksponentiaalisen kasvun loppuvaiheessa proliferaatio oli suurempaa soluilla, joiden joukkoon oli lisätty EV:tä.

Huomattavaa on, että EV-pitoisuuden ollessa $10^7 / \text{ml}$, sekä lyofilisoitujen että pakastettujen verihutale-EV:den vaikutus proliferaatioon on yhtä suuri (kuva 29 lila (lyofilisoitu)

ja vihreä (pakastettu) käyrä). EV-pitoisuuden ollessa 10^{10} /ml lyofilisoidut EV:t lisäävät kasvua verrattuna pakastettuihin EV:hin (kuva 29: vaaleansininen (lyofilisoitu) ja sininen (pakastettu) käyrä). Lyofilisoidut EV:t pitoisuuden ollessa 10^{12} /ml lisäävät proliferaatiota huomattavasti. Vertailukohdetta pakastettuihin EV:hin tällä pitoisuudella ei ollut. Yksityiskohtaisemmat kasvukäyrät ovat liitteessä 2.

6 Tulosten pohdinta

6.1 Lyofilisaation vaikutus NTA-mittaukseen

EV:den koon ja konsentraation tietäminen niiden luonnollisessa ympäristössä on eräs merkittävistä seikoista tutkittaessa niiden roolia sairauksissa ja diagnostisissa sekä terapeuttisissa sovelluksissa [24]. Verrattaessa lyofilisoidun ja pakastetun verihiutale-EV-näytteiden EV-pitoisuuksia havaittiin, että lyofilisoitu näyte sisälsi hieman enemmän EV:tä, kuin pakastettu näyte. Lyofilisaatio vaikutti EV:hin, mikä nähdään kokojakauman muutoksena. Useat tutkimukset ovat osoittaneet, että EV:den morfologia ja konsentraatio eivät kärsi lyofilisaatiosta [25; 26], mikä tukee saatuja tuloksia ja puhuu lyofilisaation puolesta.

6.2 Lyofilisaation vaikutus solunulkoisten vesikkeliin sisäänottoon soluihin

Saadut tulokset osoittivat, että PC3-solut ottivat vähän EV:tä sisäänsä riippumatta siitä, olivatko EV:t pakastettuja vai lyofilisoituja. Pakastetut EV:t kuitenkin kulkeutuivat solujen sisään paremmin kuin lyofilisoidut EV:t. Solut voivat ottaa EV:tä sisäänsä kahdella eri mekanismilla: suoralla membraanifuusiolla tai endosytoosilla [27]. Membraanifuusio vaatii onnistuakseen samankaltaisen viskositeetin fuusioituvien membraanien välillä. EV:den ja plasmamembraanin ollessa kyseessä se saavutetaan pH:n ollessa 5.0. [6.] Klatrinivälitteisen endosytoosin on todettu olevan yksi tavallisimmista endosytoosireiteistä, joilla solut ottavat EV:tä sisäänsä [28]. Saatu tulos antaa olettaa, että lyofilisaatio häiritsee membraanifuusiota tai endosytoosia. Tuloksista voidaan myös olettaa, että EV-populaatioiden välillä voisi olla eroja mekanismeissa, joilla sisäänotto soluihin tapahtuu. Suurin osa tutkimuksista on kirjallisuuden mukaan tehty eksosomeilla. Työssä käytetyt näytteet sisälsivät huomattavasti enemmän mikrovesikkeleitä kuin eksosomeja. Lyofili-

saation huomattiin vaikuttavan EV:den kokojakaumaan (kuva 23). Tuloksista ei kuitenkaan voida päätellä, ovatko solun sisään menneet EV:t eksosomeja vai mikroversikkeleit. Jotta voitaisiin verrata mahdollisia eroja eri EV-populaatioiden sisäännotossa soluihin, tulisi koe toistaa käyttämällä EV-näytteitä, jotka sisältävät vain mikroversikkeleit. Mikroversikkelit saadaan eristettyä näytteestä sentrifugoimalla näytettä $20\,000 \times g$:n voimalla, jonka jälkeen voidaan eristää eksosomit omaksi näytteeksi.

Tutkimukset ovat osoittaneet EV:den ja solujen välisen vuorovaikutuksen olevan spesifistä. EV:t voidaan kohdistaa tiettyyn vastaanottajasoluun. [27.] Lisäksi EV:den sisältämät soluväliainereseptorit vaikuttavat siihen, mitkä solut ottavat kyseiset EV:t sisäänsä [28]. Jos työn suorituksen aikana olisi saatu kasvatettua PNT2-soluja enemmän, jotta olisi saatu tarpeeksi niiden erittämiä EV:tä koetta varten, olisi voitu verrata eri lähteistä tuotettujen lyofilisoitujen EV:den sisäänottoa soluihin. Eri lähteistä tuotetut EV:t ovat vuorovaikutuksessa tietynlaisten solutyypin kanssa. Myös kohdesolun ominaisuudet voivat vaikuttaa siihen, miten sisäänotto soluihin tapahtuu. EV:den ja solujen välinen erityinen vuorovaikutus voidaan osittain selittää pintaproteiineilla, kuten tetraspaniineilla, ja muilla adheesiomolekyyleillä. [27.] Koe olisikin hyvä toistaa eri lähteistä tuotetuilla EV:illä ja eri vastaanottajasoluilla.

Saadut tulokset osoittavat, että lyofilisaatio vaikutti EV:den sisäänottoon soluihin, mikä on linjassa aiempien tutkimuksien kanssa [26; 29; 30; 31; 32]. Esimerkiksi trehaloosin on todettu stabiloivan proteiineja, solukalvoja ja liposomeja sekä pienentävän eksosomihävikkiä lyofilisaatiossa [29]. Myös mannitolin on havaittu toimivan kryoprotektanttina (jäänestoaineena) EV:den lyofilisaatiossa, kun sitä on lisätty pienenä pitoisuutena PBS-liuoksen joukkoon [26]. EV:den pinnalta löytyvä tetraspaniiniproteiini CD9 vaikuttaa soluadheesioon ja -migraatioon [30]. Lääkeaineiden lyofilisaatiossa puskurin apuaineen (esimerkiksi kryoprotektantin) puuttumisen on todettu vaikuttavan muun muassa proteiinien aktiivisuuteen [31; 32]. Koe tulisikin toistaa mannitoli- tai trehaloosilisäyksen kanssa, jotta nähtäisiin lyofilisaation todellinen vaikutus EV:den sisäänottoon soluihin.

6.3 Lyofilisaation vaikutus solujen proliferaatioon

Kaiken kaikkiaan verihiutaleiden tuottamat EV:t lisäsivät PC3-solujen proliferaatiota. Kokeen tuloksista huomataan, että lyofilisoidut EV:t kiihdyttivät proliferaatiota eksponentiaalisen kasvuvaiheen loppupuolella enemmän kuin pakastetut EV:t. Odotetumpaa olisi

ollut, jos kasvu olisi lisääntynyt EV-pitoisuuden kasvaessa. Näin ei kuitenkaan käynyt, sillä pitoisuudella 10^{10} / ml kasvu oli hitaampaa kuin EV-pitoisuudella 10^7 / ml. Tosin iCELLigence-laite on erittäin herkkä ja tarkan mittaustuloksen saaminen edellyttää tasaisen solususpension käyttöä. Tämä on voinut vaikuttaa tuloksiin. Myös pakastettujen EV:den pitoisuudeltaan 10^{12} / ml puuttuminen kokeesta sekä lyofilisoitujen EV:den (pitoisuus 10^{12} / ml) pipetoidun määrän vähäisyys heikentää tuloksen luotettavuutta. Proliferaatiokoe kuitenkin osoitti, että EV:den lyofilisaatio ei vaikuta PC3-solujen kasvuun haitallisesti.

7 Yhteenveto

Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston biotieteiden osaston ja farmaseuttisten biotieteiden osaston EV-tutkimusryhmälle. Tavoitteena oli selvittää EV:den lyofilisaatiokestävyyttä sekä vaikuttaako lyofilisaatio EV:den kykyyn kulkeutua solun sisään ja onko se haitallista soluille. EV:llä on tärkeä rooli elimistön fysiologisen homeostaasin synnyssä ja ylläpidossa. Useissa tutkimuksissa on korostettu EV:den kykyä kuljettaa bioaktiivisia proteiineja, lipidejä ja nukleiinihappoja sekä sen merkitystä geenisääntelyssä ja immuunivasteen välttelyssä puhumattakaan erilaisista terapioista tai diagnostisista hyödyistä.

Työssä käytettiin PNT2- ja PC3-soluja sekä usean luovuttajan verihiutaleita sisältävää plasmaa, joista EV:t eristettiin. EV:t karakterisoitiin Western Blot -menetelmällä sekä mitaamalla näytteistä EV:den konsentraatio ja kokojakauma NTA-menetelmällä. Eri EV-näytteet lyofilisoitiin ja liuotettiin uudestaan näytteiksi, joiden EV-konsentraatio ja -kokojakauma määritettiin. Tulosten saamiseksi EV:t leimattiin fluoresoivalla värillä ja laitettiin PC3-soluille soluun takaisinottoa varten. Lopuksi näytteet kuvattiin fluoresenssimikroskoopilla takaisinoton todentamiseksi. Tulosten perusteella voidaan todeta, että käytetyt PC3-solut ottivat sisäänsä myös lyofilisoituja EV:tä, mutta heikommin kuin pakastettuja EV:tä. Jatkossa olisi tärkeää toistaa kokeet käyttämällä eri lähteistä olevia EV:tä ja eri solulinjan soluja, jotta nähtäisiin, ovatko tulokset samankaltaisia ja toistettavia. Lisäksi koe tulisi toistaa mannitoli- tai trehaloosilisäyksen kanssa, jotta nähtäisiin lyofilisaation vaikutus EV:den sisäänottoon soluihin. Proliferaatiokokeessa testattiin, kuinka lyofilisoidut ja pakastetut EV:t vaikuttavat PC3-solujen kasvuun. Tuloksista voidaan päätellä, ettei lyofilisoidut EV:t ole haitallisia soluille ja ne säilyttävät toimintakykynsä. Proliferaa-

tiokoe tulisi toistaa luotettavammin vertailemalla eri EV-pitoisuuksia, jotta nähtäisiin niiden todellinen vaikutus kasvuun. Tämä koe antoi vain viitteitä lyofilisoitujen EV:den käytön mahdollisesta vaikutuksesta proliferaatioon.

Ajatellessa EV:den lyofilisaatiokestävyyttä tarvitaan lisää tutkimuksia eri alkuperästä olevien EV:den kulkeutumisesta erilaisiin soluihin, jotta voitaisiin kehittää niiden terapeuttisia ja diagnostisia hyötyjä. Myöskään EV:den eri eristysmenetelmiä ei ole vielä pystytty standardisoimaan, mikä aiheuttaa haasteita tutkittavan aineiston vertailtavuuteen [5]. Yhtä tärkeää on löytää kattavat ja sopivat menetelmät EV:den karakterisointiin, jotta saadaa luotettavaa dataa eri EV-populaatioiden analysoinnista. Lisätutkimuksia tarvitaan myös selvittämään oletettuja keinoja, miten solut ottavat eri EV:tä sisäänsä (membraanifuusio, erilaiset endosytoosit). [9.] Nämä kaikki auttavat jatkossa ymmärtämään paremmin lyofilisaation vaikutuksia EV:hin.

Lähteet

- 1 Smith, J.A. ym. 2015. Extracellular vesicles and their synthetic analogues in aging and age-associated brain diseases. *Biogerontology* 16/2015, s. 147–185.
- 2 Van der Pol, Edwin ym. 2012. Classification, Functions and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacological Reviews* 64/2012, s. 676–705.
- 3 <<http://extracellularvesicles.org/>> Verkkosivu. Luettu 3.5.2017.
- 4 Simpson, R. J. ym. 2008. Proteomic Profiling of Exosomes: Current Perspectives. *Proteomics* 19/2008, s. 4083–4099.
- 5 Palviainen, Mari ym. 2017. Solunulkoiset vesikkelit — isoja asioita pienessä paketissa. Helsinki: EV Core.
- 6 Yáñez-Mó, María ym. 2015. Biological Properties of Extracellular Vesicles and Their Physiological Functions. *Journal of Extracellular Vesicles* 4/2015, 27066.
- 7 Ratajczak, Mariusz Z. 2014. *Adukt Stem Cell Therapies: Alternatives to Plasticity*. New York: Springer Humana Press.
- 8 EL Andaloussi, Samir ym. 2013. Extracellular Vesicles: Biology and Emerging Therapeutic Opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 12/2013, s. 347–357.
- 9 Lee, Yi ym. 2012. Exosomes and Microvesicles: Extracellular Vesicles for Genetic Information Transfer and Gene Therapy. *Human Molecular Genetics* 21/2012, s. 125–134.
- 10 Heino, Jyrki & Vuento, Matti. 2015. *Biokemian ja solubiologian perusteet*. 3.–4. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.
- 11 Smith, James A. ym. 2015. Extracellular Vesicles Commercial Potential as By-products of Cell Manufacturing for Research and Therapeutic Use. *BioProcess International* 13/2015, s. 20–27.
- 12 Riazifar, Milad ym. 2017. Stem Cell Extracellular Vesicles: Extended Messages of Regeneration. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 57/2017, s. 125–154.
- 13 Burger D. ym. 2013. Microparticles: Biomarkers and Beyond. *Clinical Science* 124/2013, s. 423–441.
- 14 Smith, J.A. 2015. Extracellular Vesicles and Their Synthetic Analogues in Aging and Age-associated Brain Diseases. *Biogerontology* 16/2015, s. 147–185.

- 15 Hosseini-Beheshti, Elham ym. 2012. Exosomes as Biomarker Enriched Microvesicles: Characterization of Exosomal Proteins Derived from a Panel of Prostate Cell Lines with Distinct AR Phenotypes. *Molecular & Cellular Proteomics* 11/2012, s. 863–885.
- 16 Stremersch, Stephan ym. 2016. Therapeutic and Diagnostic Applications of Extracellular Vesicles. *Journal of Controlled Release* 244/2016, s. 167–183.
- 17 O'Loughlin, Aisling J. ym. 2017. Functional Delivery of Lipid-Conjugated siRNA by Extracellular Vesicles, *Molecular Therapy* 25/2017.
- 18 Qin X. ym. 2017. Cisplatin-resistant Lung Cancer Cell-derived Exosomes Increase Cisplatin Resistance of Recipient Cells in Exosomal miR-100–5p-dependent Manner. *International Journal of Nanomedicine* 12/2017, s. 3721–3733.
- 19 Wu, Junyi ym. 2017. Role of Stem Cell-derived Exosomes in Cancer. *Oncology Letters* 13/2017, s. 2855–2866.
- 20 Shigemoto-Kuroda, Taeko ym. 2017. MSC-derived Extracellular Vesicles Attenuate Immune Responses in Two Autoimmune Murine Models: Type 1 Diabetes and Uveoretinitis. *Stem Cell Reports* 8/2017, s. 1214–1225.
- 21 Sharma, Juhi ym. 2017. Therapeutic Development of Mesenchymal Stem Cells or Their Extracellular Vesicles to Inhibit Autoimmune-Mediated Inflammatory Processes in Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in Immunology* 8/2017, 526.
- 22 Nomura, Shosaku. 2017. Extracellular Vesicles and Blood Diseases. *International Journal of Hematology* 105/2017, s. 392–405.
- 23 Aatonen, Maria ym. 2012. Platelet-Derived Microvesicles: Multitalented Participants in Intercellular Communication. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 38/2012, s. 102–113.
- 24 Malvern Instruments Ltd. Nanoparticle Tracking Analysis. Verkkosivu. <<https://www.malvern.com/en/products/technology/nanoparticle-tracking-analysis>> Luettu 3.5.2017.
- 25 Frank, Julia & Fuhrmann, Gregor. 2017. Best before – lyophilisation as novel storage alternative for extracellular vesicles. Helmholtz-Institute for Pharmaceutical Research. Verkkodokumentti. <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20013078.2017.1310414>>. Luettu 19.6.2017.
- 26 Fuhrmann, Gregor & Stevens, Molly M. 2016. Stability of Extracellular Vesicles During Lyophilization — Implications for Their Pharmaceutical Use. Imperial College London, Department of Bioengineering. Verkkodokumentti. <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v5.30924>>. Luettu 19.6.2017.

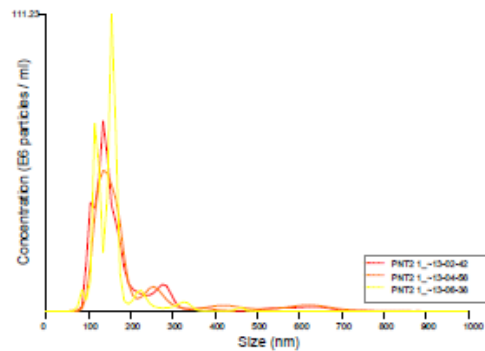
- 27 French, Kinsley C. ym. 2017. Extracellular Vesicle Docking at the Cellular Port: Extracellular Vesicle Binding and Uptake. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 67/2017, s. 48–55.
- 28 Mulcahy, Laura Ann ym. 2014. Routes and Mechanisms of Extracellular Vesicle Uptake. *Journal of Extracellular Vesicles* 3/2014, 24641.
- 29 Jain, Nishant Kumar & Roy, Ipsita. 2009. Effect of Trehalose in Protein Structure. *Protein Science* 18/2009, s. 24–36.
- 30 Lai, Ruenn Chai ym. 2010. Exosome Secreted by MSC Reduces Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Stem Cell Research* 4/2010, s. 214–222.
- 31 Duru, Chinwe ym. 2015. The Importance of Formulation in the Successful Lyophilization of Influenza Reference Materials. *Biologicals* 43/2015, s. 110–116.
- 32 Challener, Cynthia A. 2017. For Lyophilization, Excipients Really Do Matter. *BioPharm International* 30/2017, s. 32–35.

NTA-mittauksen tulokset

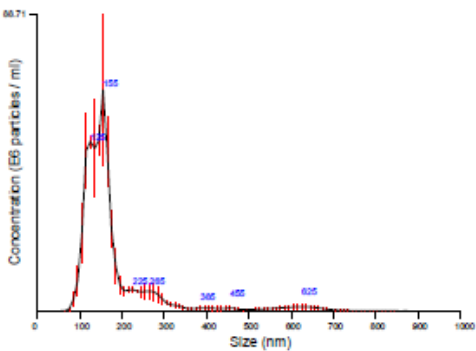
PNT2 EV, laimennos 1:250 (laimennoskerrointa ei ole huomioitu)

NANOSIGHT

PNT2 1_250 2017-05-08 13-02-25



FTLA Size / Concentration graph for Experiment:
PNT2 1_250 2017-05-08 13-02-25



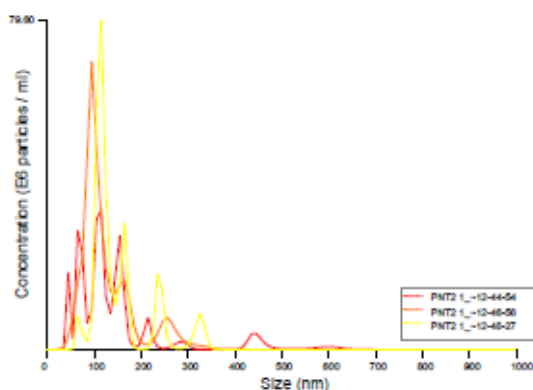
Averaged FTLA Size / Concentration
Red error bars indicate +/- 1 standard error of the mean

Included Files	Results
PNT2 1_250 2017-05-08 13-02-42 PNT2 1_250 2017-05-08 13-04-56 PNT2 1_250 2017-05-08 13-06-38	Stats: Merged Data Mean: 173.5 nm Mode: 154.5 nm SD: 101.1 nm D10: 102.5 nm D50: 141.1 nm D90: 260.2 nm
Details	Stats: Mean +/- Standard Error Mean: 173.2 +/- 13.1 nm Mode: 143.5 +/- 6.3 nm SD: 93.4 +/- 22.9 nm D10: 102.5 +/- 2.6 nm D50: 141.2 +/- 2.8 nm D90: 272.2 +/- 45.6 nm Concentration: 4.83e+008 +/- 1.38e+007 particles/ml 24.5 +/- 0.7 particles/frame 26.4 +/- 0.7 centres/frame
NTA Version: NTA 3.0 0064 Script Used: SOP Standard Measurement 01-02-25PM 08May2017.txt Time Captured: 13:02:25 08/05/2017 Operator: Saara Pre-treatment: Sample Name: PNT2 EV 1_250 Diluent: Remarks:	
Capture Settings	
Camera Type: SCMOS Camera Level: 14 Slider Shutter: 1000 Slider Gain: 400 FPS: 25.0 Number of Frames: 1498 Temperature: 18.5 - 18.6 °C Viscosity: (Water) 1.034 - 1.038 cP Dilution factor: Dilution not recorded	
Analysis Settings	
Detect Threshold: 5 Blur Size: Auto Max Jump Distance: Auto: 7.6 - 8.0 pix	

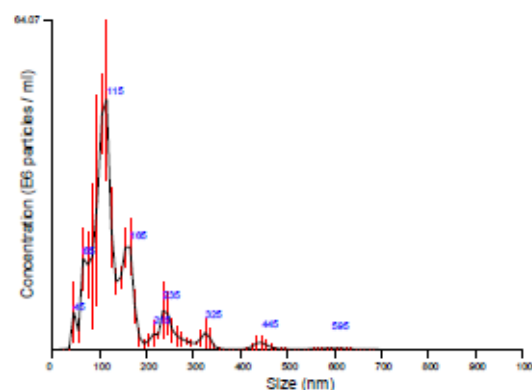
PNT2 EV, laimennos 1:500 (laimennoskerrointa ei ole huomioitu)

NANOSIGHT

PNT2 1_500 2017-05-08 12-44-17



FTLA Size / Concentration graph for Experiment:
PNT2 1_500 2017-05-08 12-44-17



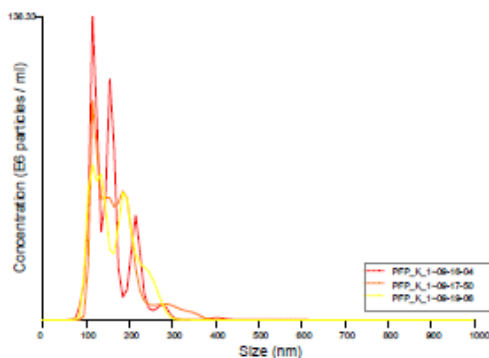
Averaged FTLA Size / Concentration
Red error bars indicate +/- 1 standard error of the mean

Included Files	Results
PNT2 1_500 2017-05-08 12-44-54 PNT2 1_500 2017-05-08 12-46-56 PNT2 1_500 2017-05-08 12-48-27	Stats: Merged Data Mean: 133.9 nm Mode: 111.0 nm SD: 75.5 nm D10: 63.1 nm D50: 106.3 nm D90: 229.7 nm
Details	Stats: Mean +/- Standard Error Mean: 134.7 +/- 7.2 nm Mode: 106.6 +/- 5.7 nm SD: 74.9 +/- 14.4 nm D10: 69.9 +/- 11.8 nm D50: 105.0 +/- 5.1 nm D90: 221.4 +/- 6.6 nm Concentration: 3.37e+008 +/- 3.26e+007 particles/ml 17.1 +/- 1.7 particles/frame 20.0 +/- 1.3 centres/frame
NTA Version: NTA 3.0 0064 Script Used: SOP Standard Measurement 12-44-17PM 08May2017.txt Time Captured: 12:44:17 08/05/2017 Operator: Saara Pre-treatment: Sample Name: PNT2 EV 1_500 Diluent: Remarks:	
Capture Settings	
Camera Type: SCMOS Camera Level: 14 Slider Shutter: 1000 Slider Gain: 400 FPS: 25.0 Number of Frames: 1498 Temperature: 18.2 - 18.3 °C Viscosity: (Water) 1.043 - 1.045 cP Dilution factor: Dilution not recorded	
Analysis Settings	
Detect Threshold: 3 Blur Size: Auto Max Jump Distance: Auto: 8.0 - 11.2 pix	

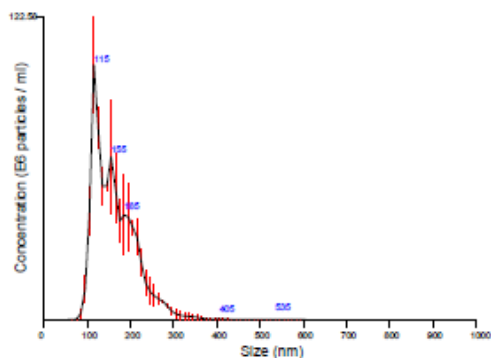
PFP EV Lyofilisoitu, laimennos 1:10 000 (laimennoskerrointa ei ole huomi- oitu) ennen väriaineleimausta

NANOSIGHT

PFP_K_1_10000 2017-05-29 09-15-43



FTLA Size / Concentration graph for Experiment:
PFP_K_1_10000 2017-05-29 09-15-43



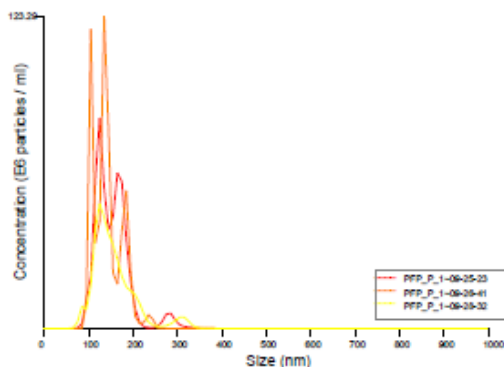
Averaged FTLA Size / Concentration
Red error bars indicate +/- 1 standard error of the mean

<p>Included Files</p> <p>PFP_K_1_10000 2017-05-29 09-16-04 PFP_K_1_10000 2017-05-29 09-17-50 PFP_K_1_10000 2017-05-29 09-19-06</p> <p>Details</p> <p>NTA Version: NTA 3.0 0064 Script Used: SOP Standard Measurement 09-15-43AM 29May2017.txt Time Captured: 09:15:43 29/05/2017 Operator: Saara Pre-treatment: Sample Name: PFP_K_1_10000 Diluent: Remarks:</p> <p>Capture Settings</p> <p>Camera Type: sCMOS Camera Level: 14 Slider Shutter: 1000 Slider Gain: 400 FPS: 25.0 Number of Frames: 1498 Temperature: 18.3 - 18.4 °C Viscosity: (Water) 1.041 - 1.044 cP Dilution factor: Dilution not recorded</p> <p>Analysis Settings</p> <p>Detect Threshold: 5 Blur Size: Auto Max Jump Distance: Auto: 8.0 - 8.4 pix</p>	<p>Results</p> <p>Stats: Merged Data</p> <p>Mean: 158.9 nm Mode: 117.0 nm SD: 49.4 nm D10: 101.6 nm D50: 144.6 nm D90: 218.2 nm</p> <p>Stats: Mean +/- Standard Error</p> <p>Mean: 159.0 +/- 4.2 nm Mode: 116.8 +/- 0.5 nm SD: 49.0 +/- 1.9 nm D10: 101.4 +/- 1.7 nm D50: 147.1 +/- 3.8 nm D90: 220.1 +/- 5.4 nm Concentration: 7.55e+008 +/- 1.59e+007 particles/ml 38.3 +/- 0.8 particles/frame 39.0 +/- 0.8 centres/frame</p>
--	---

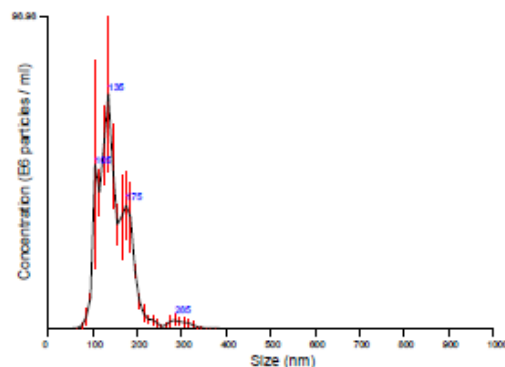
PFP EV Pakastettu, laimennos 1:10 000 (laimennoskerrointa ei ole huomioitu) ennen väriaineleimausta

NANOSIGHT

PFP_P_1_10000 2017-05-29 09-25-09



FTLA Size / Concentration graph for Experiment:
PFP_P_1_10000 2017-05-29 09-25-09



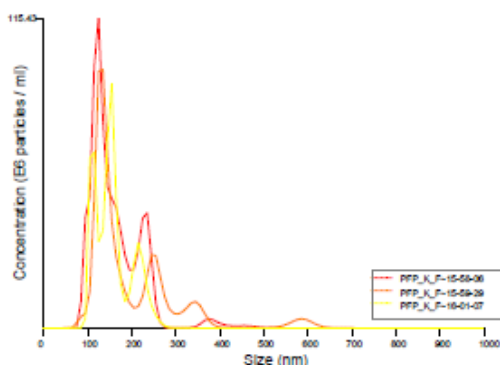
Averaged FTLA Size / Concentration
Red error bars indicate +/- 1 standard error of the mean

<p>Included Files</p> <p>PFP_P_1_10000 2017-05-29 09-25-23 PFP_P_1_10000 2017-05-29 09-26-41 PFP_P_1_10000 2017-05-29 09-28-32</p> <p>Details</p> <p>NTA Version: NTA 3.0 0064 Script Used: SOP Standard Measurement 09-25-09AM 29May2017.txt Time Captured: 09:25:09 29/05/2017 Operator: Saara Pre-treatment: Sample Name: PFP_P_1_10000 Diluent: Remarks:</p> <p>Capture Settings</p> <p>Camera Type: sCMOS Camera Level: 14 Slider Shutter: 1000 Slider Gain: 400 FPS: 25.0 Number of Frames: 1498 Temperature: 18.4 - 18.6 °C Viscosity: (Water) 1.036 - 1.039 cP Dilution factor: Dilution not recorded</p> <p>Analysis Settings</p> <p>Detect Threshold: 5 Blur Size: Auto Max Jump Distance: Auto: 8.6 - 8.6 pix</p>	<p>Results</p> <p>Stats: Merged Data Mean: 144.0 nm Mode: 134.2 nm SD: 39.2 nm D10: 96.7 nm D50: 130.4 nm D90: 181.6 nm</p> <p>Stats: Mean +/- Standard Error Mean: 144.9 +/- 4.2 nm Mode: 129.3 +/- 3.6 nm SD: 39.4 +/- 4.9 nm D10: 99.2 +/- 2.7 nm D50: 132.9 +/- 3.1 nm D90: 185.8 +/- 7.9 nm Concentration: 4.86e+008 +/- 6.24e+007 particles/ml 24.7 +/- 3.2 particles/frame 25.1 +/- 3.1 centres/frame</p>
--	---

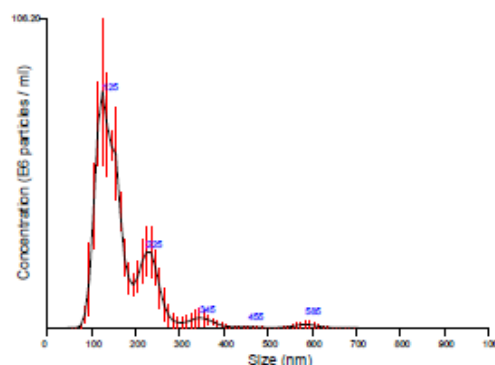
**PFP EV Lyofilisoitu, laimennos 1:50 (laimennoskerrointa ei ole huomioitu)
väriainepuhdistuksen jälkeen**

NANOSIGHT

PFP_K_F_1_50 2017-05-29 15-57-42



FTLA Size / Concentration graph for Experiment:
PFP_K_F_1_50 2017-05-29 15-57-42



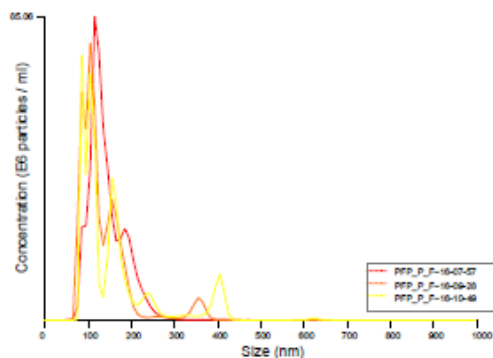
Averaged FTLA Size / Concentration
Red error bars indicate +/- 1 standard error of the mean

<p>Included Files</p> <p>PFP_K_F_1_50 2017-05-29 15-58-06 PFP_K_F_1_50 2017-05-29 15-59-29 PFP_K_F_1_50 2017-05-29 16-01-07</p> <p>Details</p> <p>NTA Version: NTA 3.0 0064 Script Used: SOP Standard Measurement 03-57-42PM 29May2017.txt Time Captured: 15:57:42 29/05/2017 Operator: Saara Pre-treatment: Sample Name: PFP_K_F_1_50 Diluent: PBS Remarks:</p> <p>Capture Settings</p> <p>Camera Type: sCMOS Camera Level: 14 Slider Shutter: 1000 Slider Gain: 400 FPS: 25.0 Number of Frames: 1498 Temperature: 18.9 - 19.0 °C Viscosity: (Water) 1.024 - 1.027 cP Dilution factor: Dilution not recorded</p> <p>Analysis Settings</p> <p>Detect Threshold: 5 Blur Size: Auto Max Jump Distance: Auto: 7.8 - 8.4 pix</p>	<p>Results</p> <p>Stats: Merged Data Mean: 165.4 nm Mode: 124.9 nm SD: 72.4 nm D10: 100.5 nm D50: 138.6 nm D90: 237.0 nm</p> <p>Stats: Mean +/- Standard Error Mean: 165.5 +/- 11.5 nm Mode: 135.6 +/- 9.1 nm SD: 66.0 +/- 17.2 nm D10: 101.0 +/- 3.8 nm D50: 138.0 +/- 2.5 nm D90: 247.9 +/- 30.8 nm Concentration: 6.76e+008 +/- 7.30e+007 particles/ml 34.3 +/- 3.7 particles/frame 36.0 +/- 3.8 centres/frame</p>
--	--

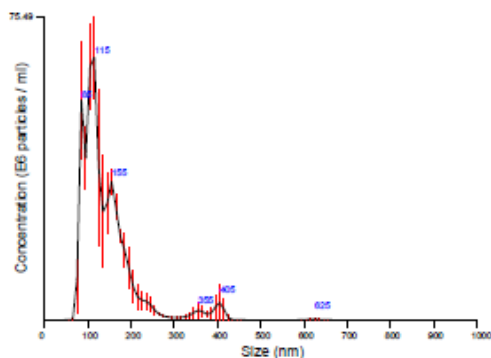
**PFP EV Pakastettu, laimennos 1:50 (laimennoskerrointa ei ole huomioitu)
väriainepuhdistuksen jälkeen**

NANOSIGHT

PFP_P_F_1_50 2017-05-29 16-07-42



FTLA Size / Concentration graph for Experiment:
PFP_P_F_1_50 2017-05-29 16-07-42



Averaged FTLA Size / Concentration
Red error bars indicate +/- 1 standard error of the mean

<p>Included Files</p> <p>PFP_P_F_1_50 2017-05-29 16-07-57 PFP_P_F_1_50 2017-05-29 16-09-28 PFP_P_F_1_50 2017-05-29 16-10-49</p> <p>Details</p> <p>NTA Version: NTA 3.0 0064 Script Used: SOP Standard Measurement 04-07-42PM 29May2017.txt Time Captured: 16:07:42 29/05/2017 Operator: Saara Pre-treatment: Sample Name: PFP_P_F_1_50 Diluent: PBS Remarks:</p> <p>Capture Settings</p> <p>Camera Type: sCMOS Camera Level: 14 Slider Shutter: 1000 Slider Gain: 400 FPS: 25.0 Number of Frames: 1498 Temperature: 19.0 - 19.1 °C Viscosity: (Water) 1.022 - 1.024 cP Dilution factor: Dilution not recorded</p> <p>Analysis Settings</p> <p>Detect Threshold: 5 Blur Size: Auto Max Jump Distance: Auto: 8.5 - 9.5 pix</p>	<p>Results</p> <p>Stats: Merged Data</p> <p>Mean: 139.2 nm Mode: 110.8 nm SD: 66.6 nm D10: 77.2 nm D50: 113.9 nm D90: 197.8 nm</p> <p>Stats: Mean +/- Standard Error</p> <p>Mean: 139.6 +/- 7.7 nm Mode: 103.6 +/- 9.1 nm SD: 63.4 +/- 15.2 nm D10: 79.5 +/- 4.7 nm D50: 111.6 +/- 4.9 nm D90: 220.0 +/- 38.5 nm Concentration: 4.96e+008 +/- 1.94e+007 particles/ml 25.2 +/- 1.0 particles/frame 26.0 +/- 1.0 centres/frame</p>
--	---

Proliferaatiokokeen kasvukäyrät

